



# Effets de l'exposition aux herbicides chez des Mollusques marins exploités. Approche in vitro chez l'ormeau, *Haliotis tuberculata* et approche in vivo chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Antoine Mottier

## ► To cite this version:

Antoine Mottier. Effets de l'exposition aux herbicides chez des Mollusques marins exploités. Approche in vitro chez l'ormeau, *Haliotis tuberculata* et approche in vivo chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Caen Basse-Normandie, 2013. Français. NNT: . tel-01153793

**HAL Id: tel-01153793**

**<https://hal.science/tel-01153793>**

Submitted on 20 May 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE CAEN BASSE-NORMANDIE

UFR : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole doctorale Biologie Intégrative Santé Environnement

## THESE

Présentée par

**M. Antoine MOTTIER**

soutenue le 17 décembre 2013

En vue de l'obtention du

**Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie**

**Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations**

(Arrêté du 07 août 2006)

Sujet de la thèse :

**Effets de l'exposition aux herbicides chez des Mollusques marins exploités. Approche *in vitro* chez l'ormeau, *Haliotis tuberculata* et approche *in vivo* chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.**

devant le jury composé de :

M. Michel AUFFRET  
Mme Claude CASELLAS  
M. Alain GEFFARD  
M. Jean-Marc LEBEL  
Mme Florence MENET-NEDELEC  
Mme Katherine COSTIL

Professeur, Université de Bretagne Occidentale  
Professeur, Université Montpellier 1  
Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne  
Professeur, Université de Caen  
Cadre de Recherche à l'Ifremer  
Maître de Conférences HDR, Université de Caen

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de thèse



# Avant-propos

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'École Doctorale Normandie de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EDNBISE 497), dans le laboratoire de Biologie des Mollusques marins et des Écosystèmes Associés (CNRS INEE FRE 3484 BioMEA) de l'Université de Caen.



Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet INTERREG IV-A CHRONEXPO. Elle a été cofinancée par les Fonds Européens de Développement Régional (FEDER bourse 4059) et par la région Basse-Normandie.



Le projet CHRONEXPO a été piloté par le docteur Bruno Fiévet de L'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) et a regroupé cinq partenaires anglais et français : University of Plymouth, University of Portsmouth, Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), IRSN, Université de CAEN.





# Remerciements

Tout d'abord je remercie les professeurs Michel Mathieu, ancien directeur du laboratoire, et Pascal Sourdain directeur actuel du laboratoire de Biologie des Mollusques Marins et des Écosystèmes associés (CNRS INEE - FRE3484 BioMEA) pour m'avoir accueilli pendant mes trois années de thèse.

Mes plus sincères remerciements vont à ma directrice de thèse, le docteur Katherine Costil. Je pense avoir eu une chance énorme de pouvoir faire ma thèse sous ta direction car j'ai bénéficié d'un encadrement d'une très grande qualité tant sur le plan scientifique que humain. Tu as toujours été disponible et j'espère un jour pouvoir avoir autant de qualités scientifiques que toi. Vraiment un GRAND GRAND GRAND MERCI.

Je tiens à remercier les professeurs Claude Casellas et Michel Auffret pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Leur expertise scientifique sur ce travail et leur participation au jury de thèse sont un honneur pour moi.

Merci aux professeurs Jean-Marc Lebel et Alain Geffard ainsi qu'au docteur Florence Menet-Nedelec pour avoir été examinateurs de cette thèse et pour tous les conseils et remarques avisés qu'ils ont pu faire le jour de ma soutenance.

Un grand merci au docteur Antoine Serpentine pour l'ensemble de sa contribution à ce travail et tout particulièrement pour la partie culture cellulaire qui n'aurait pas été possible sans son aide.

Merci au docteur Bruno Fiévet de l'IRSN, coordinateur du projet Chronexpo pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma thèse dans un cadre idéal au niveau des moyens alloués et très enrichissant d'un point de vue scientifique.

Je tiens à remercier le docteur Valérie Kientz-Bouchard, Christelle Dubreuille et le laboratoire d'analyse départemental Frank Duncombe pour les analyses chimiques des différentes molécules testées lors de ce travail.

Merci à la Société Atlantique de MARiculture et tout particulièrement au docteur Blandine Diss et à Stéphane Duval de nous avoir fourni les larves pédivéligères et les

juvéniles d’huîtres indispensables à toutes les expérimentations.

Une attention toute particulière à Béatrice Adeline pour son aide très précieuse pour la préparation des lames histologiques.

Merci à Maryline Guillamin pour son expertise en cytométrie en flux ainsi que pour tous les conseils concernant l’analyse des données.

Je tiens à remercier l’ensemble du personnel du laboratoire de radioécologie de Cherbourg-Octeville pour l’accueil qui m’a été fait lors de mes différents séjours "bio-mol". Un merci tout particulier à Claire Voiseux pour toute l’aide apportée en biologie moléculaire.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire BioMea, professeurs, maîtres de conférences et personnels techniques qui ont pu contribuer de près ou de loin à la rédaction de ce manuscrit.

Merci à l’ensemble des stagiaires que j’ai encadré et qui m’ont beaucoup aidé, certains sont même devenus des amis. Dans le désordre merci à Florian, Adèle, Camilla, Carole, Quentin, Alexis et Lauris. De tous ceux que j’ai côtoyé, bon courage à Quentin (le nageur fou qui est passé chez les microalgues) et Lauris (Le caribou lécheur de papillons) pour la suite de votre thèse, j’espère être là quand vous finirez. Un énorme merci à Alexis (mon digne successeur) pour le travail que tu as fait sur les activités enzymatiques et pour toute l’aide que tu m’as apporté lors de la dernière ligne droite : bon courage pour cette aventure !

Pour n’oublier personne parmi tous les copains du laboratoire, je vais faire mes remerciements de bureau en bureau (en commençant par le mien). Un grand merci à Michael Gras pour sa bonne humeur et son aide sur les multiples logiciels libres qu’il maîtrise, merci à Christiane Rakotomalala pour avoir supporté (jusqu’à un certain point) mon péristaltisme, merci à Nicolas Schiffrine pour m’avoir fait découvrir ce merveilleux logiciel qu’est  $\text{\LaTeX}$ , merci à mon acolyte Martin Ubertini pour toutes les discussions scientifiques et beaucoup moins scientifiques dans et en dehors du labo (j’espère que le sud te réussit), merci aussi à mon co-thésard M. Charles Le Pabic pour sa bonne humeur (moins que Michael quand même) et pour l’ensemble de sa contribu-

tion à ce travail. Un re-grand merci à Alexis pour avoir participé à mon enrichissement linguistique Normand "À bère ou j'tue l'quin". Dans le petit bureau du fond, merci à Alexandre Fellous pour toutes nos discussions sur les appareils photos et sur la théorie du "plus il fait froid, plus les jupes sont courtes..." poupou, merci également à Adrien Bosseboeuf (va falloir couper ces cheveux) et Valérie Cornet (la geekette aquariophile). Dans le grand bureau, merci à Nadège (la plus vieille), Elmina (la plus râleuse), Christelle (la plus sage) et Stéphanie (la plus elfe). Merci également à mon Libanais préféré pour sa gentillesse et nos discussions, à la Bajo-pétasse pour les nombreuses descentes du Gaillon passées à papoter, à la minimoy de l'île de Ré pour nos cafés clopes matinaux pendant la rédaction, à mister Enault pour tout ses conseils en geekeries diverses et variées (futur daddy) et enfin un grand merci à la meilleur réalisatrice de film de thèse qui existe : Mireille Maxou pour toutes les discussions, rigolades et remontages de moral. Enfin dans l'ancien bureau des post-docs, je remercie Carole Di Poi et Laetitia Minguez pour tous les conseils qu'elles ont pu me donner. Je n'allais pas oublier deux personnes qui compte aussi énormément pour moi et dont je suis inséparable depuis la première année à l'université de Caen : Pauline et Thomas. Merci à vous deux pour tout les moments que l'on a passé ensemble durant ces 8-9 années, ne changez rien vous êtes géniaux.

Merci également à Alexandre Devos qui cumule le double statut d'ami d'enfance et de collègue au sein du projet Chronexpo. C'était vraiment super d'être dans le même bateau ! Vraiment des tonnes de remerciements pour m'avoir formé à la biologie moléculaire et pour avoir passé autant de temps sur mes échantillons.

Un grand merci à tout mes amis en dehors du laboratoire qui m'ont un peu moins vu durant ces trois années. J'espère pouvoir rattraper le temps perdu.

Merci à toute ma famille pour son soutien inconditionnel durant la thèse.

La personne à qui je dédie ce travail est ma partenaire et maman de ma petite Lou (que je remercie d'être venue au monde 3 semaines avant la soutenance). Merci Lucie, pour ton soutien au quotidien, ta patience, tes sourires, merci pour tout !





# Liste des abréviations

$\gamma$ -HCH	lindane
2,4-D	acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
2-MCP	2-Methyl-4-ChloroPhénol
AChE	AcétylCholineEstérase
AMPA	Amino Methyl Phosphonic Acid
ATP	Adénosine Tri Phosphate
CAS	Chemical Abstract Service
CATs	CATalases
CE <sub>10</sub>	Concentration Efficace médiane pour 10% de l'effet maximal
CE <sub>50</sub>	Concentration Efficace médiane pour 50% de l'effet maximal
CEFAS	Center for Environment Fisheries and Aquaculture Science
CHRONEXPO	CHRONic EXPOsure
CL <sub>50</sub>	Concentration Létale pour 50% de la population étudiée
CME0	Concentration Minimale avec Effet Observé
CMR	Carcinogènes Mutagènes Repro-toxiques
CYP450	CYtochrome-P-450
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DCSMM	Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DEA	DesEthyl-Atrazine
DET	DesEthyl-Ter-buthylazine
DFP	DiisopropylFluoroPhosphate
DGS	Direction Générale de la Santé
DIA	DesIsopropyl-Atrazine
dicamba	3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid

DPMU	DichloroPhenyl-Methyl-Urea
DPU	DichloroPhenyl-Urea
DRO	Dérivés Réactifs de l'Oxygène
EPA	Environmental Protection Agency
FAO	Food and Agriculture Organisation
GABA	acide $\gamma$ amino butyrique
GPXs	Glutathion PeroXydases
GST	Glutathion-S-transférase
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HBCD	HexaBromoCyclodoDécane
HSCR	HypertenSion-related Calcium-Regulated gene
HSP	Heat Shock Protein
IPMU	Isopropyl-Phenyl-Methyl-Urea
IPU	Isopropyl-Phenyl-Urea
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
iso-OMPA	tetraisopropyl pyrophosphoramide
L-DOPA	L-3,4-DihydrOxyPhenylAlanine
LNIs	Lipides Neutres Insaturés
MCP	MonoCrotoPhos
MCPP	MeCoProP
MCPP-P	MeCoProP-P
MDA	Malondialdéhyde
MXR	Multi Xenobiotic Resistance
NSO	North Sea Oil
ORP	Observatoire des Résidus de Pesticides
OsPar	Oslo-Paris
PBDEs	PolyBromoDiphénylEthers
PCBs	Poly-Chloro-Biphenyl
PCDDs	PolyChloroDibenzo-p-Dioxines
PCDFs	PolyChloroDibenzo-Furanes
PF	<i>Post</i> Fécondation

POCIS	Polar Organic Chemical Integrative Sampler
POEA	POly-Ethoxylated tallow Amine
PPPs	Produits PhytoPharmaceutiques
R <sub>AT</sub> <sup>®</sup>	Roundup Allées et Terrasses <sup>®</sup>
R <sub>EX</sub> <sup>®</sup>	Roundup EXpress <sup>®</sup>
REMI	RÉseau de contrôle MIcrobiologique des zones de production conchyliques
REPHY	RÉseau de surveillance du phytoplancton et des PHYcotoxines
REPOM	Réseau de surveillance de la qualité des Eaux et sédiments des POrts Maritimes
RHLN	RÉseau Hydrologique Littoral Normand
RNO	Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin
ROCCH	Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral
ROS	Reactiv Oxygen Species
RT-PCR	PCR en temps réel
SGF	Scope For Growth
SODs	SuperOxyde Dismutases
SSH	Suppression Subtractive Hybridation
STEPS	STations d'ÉPuration
TBTs	TriButyléTains
TCIN	chlorothalonil
UE	Union Européenne
UV	Ultra Violet



# Liste des tableaux

1.1	Position systématique de l'ormeau, <i>H. tuberculata</i> . . . . .	8
1.2	Position systématique de l'huître creuse, <i>C.gigas</i> . . . . .	10
1.3	Valeurs médianes, maximum et minimum de différents composés retrouvés dans les chairs de <i>Mytilus spp.</i> et <i>Crassostrea gigas</i> obtenues sur 5 ans (2000-2004). Les valeurs sont exprimées par rapport au poids sec des animaux. D'après RNO (2006). . . . .	23
2.1	Concentrations used for the NRRA and phagocytic activity assessment . . . . .	61
3.1	Results (mean values in $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) of the herbicide analyses performed for both endpoints at the beginning of the experiment and after 24 h or 48 h of exposure to glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA) and two commercial formulations : Roundup Express® and Roundup Allées et Terrasses®. . . . .	88
3.2	Ecotoxicological parameters calculated for (1) the embryotoxicity tests (rates of mortality and abnormalities in D-shaped larvae) and (2) the rates of pediveliger larvae mortality and metamorphosis after 48 h exposures to 4 herbicide substances : glyphosate (GLY), AMPA, Roundup Express® ( $R_{\text{EX}}$ ) and Roundup Allées et Terrasses® ( $R_{\text{AT}}$ ). $\text{EC}_X$ = effective concentration (in $\mu\text{g L}^{-1}$ ) which induces an effect on X% of the population (10 or 50%). . .	91
3.3	Ecotoxicological parameters corrected by considering the measured concentrations of herbicides (instead of the nominal concentrations ; for comparison, see Table (3.2) for the embryotoxicity tests and the rates of pediveliger larvae metamorphosis. GLY = glyphosate ; AMPA = glyphosate metabolite ; $R_{\text{EX}}$ = Roundup Express® and $R_{\text{AT}}$ = Roundup Allées et Terrasses®. $\text{EC}_X$ = effective concentration (in $\mu\text{g L}^{-1}$ ) that induces an effect on X% of the population (10 or 50%). . . . .	92
5.1	Pesticides concentrations (mean values in $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) measured for both endpoints at the beginning of the experiment and after 24h or 36h of exposure to MCPP and MCPP-P. (NC= Nominal Concentrations, MC=Measured Concentrations, % = percentage of differences between NC and MC) . . . . .	119

5.2	Ecotoxicological parameters calculated for the embryotoxicity tests (rates of abnormalities in D-shaped larvae) and the rates of pediveliger larvae metamorphosis after 48 h exposures to 3 herbicide substances : Mecoprop (MCP), Mecoprop-P (MCP-P) and 4-Chloro-2-methylphenol (2-MCP). Ecotoxicological parameters are given for nominal and corrected concentration. ECX =effective concentration (in $\mu\text{g L}^{-1}$ ) which induces an effect on X% of the population (10 or 50%). na= non-available data . . . . .	120
5.3	Ecotoxicological data obtained from embryotoxicity test in <i>Crassostrea gigas</i> . . . . .	131
6.1	Caractéristiques principales des juvéniles utilisés lors des expériences d'exposition sub-chroniques aux herbicides et adjuvants . . . . .	141
6.2	Stades de gamétogenèse chez l'huître creuse avec les phases équivalentes à celles indiquées dans l'introduction générale. Modifié d'après Lubet (1969). . . . .	149
6.3	Echelles semi-quantitatives adoptées pour qualifier l'ampleur des trois types d'altérations tissulaires. Les pourcentages indiqués correspondent à la proportion de tissus affectée par l'altération. . . . .	150
6.4	Séquence et numéro d'ordre GenBank des amorces utilisées pour quantifier l'expression des gènes cibles (†) et des gènes de référence (●). . . . .	160
6.5	Concentrations en glyphosate dans les bacs d'eau de mer lors d'expérimentations préliminaires en début d'expérimentation et après 24h d'incubation. . . . .	174
7.1	Classification de la toxicité pour les espèces aquatiques adoptée par l'Agence de Protection de l'Environnement américaine (U.S. EPA). . . . .	200
7.2	Catégories pour la toxicité des différents composés testés selon la classification de l'U.S. EPA . . . . .	200

# Liste des figures

1.1	Espèces animales et types de contaminants étudiés par les partenaires impliqués dans le projet CHRONEXPO. . . . .	6
1.2	Classification des mollusques. <i>D'après</i> Lecointre et Le Guyader (2006). . . . .	7
1.3	Schéma de la face dorsale d' <i>Haliotis tuberculata</i> sans la coquille. <i>D'après</i> Le Petit (2009). . .	9
1.4	Développement de l'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i> . 1 : oeuf ; 2 : stade morula ; 3 : larve trocho- phore ; 4 : larve véligère après éclosion ; 5 : larve véligère à la fin du stade planctonique ; 6-7 : larve benthique ; 8 : juvénile . . . . .	10
1.5	Schéma de l'anatomie de l'huître creuse <i>C.gigas</i> . <i>D'après</i> Howard et Smith (1983). . . . .	12
1.6	Cycle biologique de l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> . 1. Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes. 2. Embryon au stade morula (2-3 heures). 3. Larves D (24 heures). 4. Larves véligères (14 jours). 5. Larve pédivéligère (18 jours). 6. Naissain post-fixation (1 mois). 7. Naissain (2 mois). 8. Naissain (6 mois). 9. Adulte (10 mois). 10. Géniteur mature (10 mois). (Remarque : l'âge indiqué pour les photos 7 à 10 est représentatif d'huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole). <i>D'après</i> Dégremont (2003). . . . .	13
1.7	Évolution de l'aquaculture mondiale en eaux douces et marines de 1950 à 2010. <i>D'après</i> FAO (2013). . . . .	14
1.8	Production conchylicole en France pour l'année 2010 et détail des régions productrices d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> . . . . .	16
1.9	Cycle et méthodes d'élevages de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> . <i>D'après</i> FAO (2010). . . .	17
1.10	Cartes du littoral français représentant la contamination par les métaux dans les chairs des moules (rouge) et des huîtres (bleu). A : argent ; B : cadmium ; C : chrome ; D : cuivre ; E : mercure ; F : nickel ; G : plomb ; H : vanadium ; I : zinc. Pour chaque couple contaminant- coquillage, la médiane nationale est calculée sur l'ensemble des observations. La médiane est ensuite calculée pour chaque point et rapportée à la médiane nationale. Les résultats sont répartis en 4 classes : 0 à 2 fois, 2 à 4 fois, 4 à 6 fois, égal ou supérieur à 6 fois la médiane nationale. Sur la carte, chaque classe est associée à une taille de symbole. <i>D'après</i> ROCCH (2013). . . . .	24
1.11	Évolution des ventes de pesticides en France (tonnes) sur la période 1998-2011. <i>D'après</i> UIPP (2012). . . . .	28
1.12	A : nombre de pesticides quantifiés en 2011 dans les eaux de surface ; B : concentrations totales moyennes des pesticides dans les eaux de surface en 2011. <i>D'après</i> Commissariat Général au Développement Durable (2013). . . . .	29

1.13 Classement des molécules les plus quantifiées dans les rivières de France métropolitaine en 2011. <i>D'après</i> Commissariat Général au Développement Durable (2013). . . . .	30
1.14 Cartes du littoral français représentant la contamination par les pesticides dans les chairs des moules (rouge) et des huîtres (bleu). A : DDT ; B : lindane. Pour chaque couple contaminant-coquillage, la médiane nationale est calculée sur l'ensemble des observations. La médiane est ensuite calculée pour chaque point et rapportée à la médiane nationale. Le résultat est réparti en 4 classes : 0 à 2 fois, 2 à 4 fois, 4 à 6 fois, égal ou supérieur à 6 fois la médiane nationale. Sur la carte, chaque classe est associée à une taille de symbole. <i>D'après</i> (ROCCH, 2013) . . . . .	33
1.15 Représentation des niveaux d'étude des biomarqueurs et de leur intérêt au niveau écologique ou mécanistique. <i>D'après</i> (Snape <i>et al.</i> , 2004) . . . . .	35
1.16 Schéma des mécanismes de déstabilisation des lysosomes. Modifié <i>d'après</i> Pellerin-Massicotte et Tremblay (1998) . . . . .	41
1.17 Schéma représentant les différentes phases du processus de phagocytose . <i>D'après</i> Paillard (2004) . . . . .	43
1.18 Schéma récapitulatif des méthodes utilisées pour le prélèvement, l'exposition des hémocytes et les biomarqueurs mis en œuvre pour évaluer l'effet des herbicides <i>in vitro</i> . . . . .	56
2.1 Cell viability $\pm$ standard deviation (in % of values recorded for control group) after 72h exposure to glyphosate (A) Roundup Express® (R <sub>EX</sub> ) (B) and POEAs (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different. . . . .	63
2.2 Neutral red retention $\pm$ standard deviation (in % of values recorded for control group) after 72h exposure to glyphosate (A) Roundup Express® (R <sub>EX</sub> ) (B) and POEAs (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different. . . . .	64
2.3 Phagocytic activity expressed in % of haemocytes that had phagocytosed 3 beads or more $\pm$ standard deviation (in % of values recorded for control group) after 72h exposure to glyphosate (A) Roundup Express® (R <sub>EX</sub> ) (B) and POEAs (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different. . . . .	65
2.4 Schéma récapitulatif de la méthode utilisée pour la réalisation du test d'embryotoxicité .	74
2.5 Schéma récapitulatif de la méthode utilisée pour l'évaluation du test de la métamorphose.	75
3.1 Light microscopy images (x400) showing the morphology of the developmental stages of <i>Crassostrea gigas</i> at 48 h : (A) normal D-shaped veliger ; (B) D-shaped veliger showing abnormal shell ; (C) D-shaped veliger presenting hypertrophied mantle ; (D) D-shaped veliger exhibiting both shell/hinge and mantle abnormalities ; (E) embryo showing arrested development at the "old embryo" stage. . . . .	85
3.2 (A) : A 21-day-old <i>C. gigas</i> pediveliger larva showing velum (v) and feet (f), versus (B) : a 20-day-old metamorphosed larva showing developed gills (g) and a shell growth (s). . . .	86



- 3.3 Net percentages of normal development ( $\text{NPN}_e$ ) ( $\pm$  SEM) in *C. gigas* embryo-larvae observed after 48 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.10 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate (A) and AMPA (B) or 2,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Roundup Express® ( $\text{R}_{\text{EX}}$ ) (C) and Roundup Allées et Terrasses® ( $\text{R}_{\text{AT}}$ ) (D). Since no normal larvae were observed at the tested concentrations of 4,000, 6,000 and 8,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{R}_{\text{EX}}$  and  $\text{R}_{\text{AT}}$ , they are therefore not represented. The concentrations that do not share a letter are significantly different; by convention, the controls belong to group a. For  $\text{R}_{\text{AT}}$ ,  $\text{NPN}_e$  data lacking at 1,400  $\mu\text{g L}^{-1}$  due to a technical problem. . . . . 89
- 3.4 The occurrence of the various types of abnormalities affecting embryo-larval development in *C. gigas* after 48 h of herbicide exposure in relation to the concentrations of 4 chemicals : (A) glyphosate; (B) AMPA; (C) Roundup Express® and (D) Roundup Allées et Terrasses®. NOR : normal D-shaped larvae; SHEL : D-shaped larvae exhibiting shell and/or hinge abnormalities; MANT : D-shaped larvae showing a hypertrophied mantle; MASH : D-shaped larvae presenting an abnormality affecting both shell/hinge and mantle; EMB : “old embryo”. . . . . 93
- 3.5 Net percentages of metamorphosed larvae ( $\text{NPM}_e$ ) ( $\pm$  SEM) observed after 24 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.1 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate and AMPA (A) or 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Roundup Express® ( $\text{R}_{\text{EX}}$ ) (B) and Roundup Allées et Terrasses® ( $\text{R}_{\text{AT}}$ ) (C). Since no metamorphosis was observed at the tested concentration of 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{R}_{\text{EX}}$  and  $\text{R}_{\text{AT}}$ , the data are therefore not presented. The concentrations that do not share a letter are significantly different; by convention, the controls belong to group a. . . . . 95
- 4.1 **A.** Net percentages of normal development ( $\text{NPN}_e$ ) in *Crassostrea gigas* embryo-larvae observed after 36 h of exposure to Genamin T-200® at concentrations ranging from 0.10 to 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  (as  $\text{NPN}_e$  at 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  is equal to 0.00%, it is not represented). **B.** Net percentages of metamorphosis ( $\text{NPM}_e$ ) in *C. gigas* pediveliger larvae observed after 24 h of exposure to Genamin T-200 at concentrations ranging from 0.10 to 6000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (as  $\text{NPM}_e$  from 6000  $\mu\text{g L}^{-1}$  are equal to 0.00%, they are not represented). The concentrations that do not share a letter are significantly different. Data are illustrated with a box and whisker diagram : the bottom and top of the box correspond to the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, and the band near the middle of the box represents the median. The ends of the whiskers represent the minimum and maximum of all of the data for a given concentration. All data are plotted next to the box; black dots are used to plot the mean and black dashes to represent standard errors. . . . . 107
- 5.1 Net percentages of normal development ( $\text{NPN}_e$ ) ( $\pm$  SEM) in *C. gigas* embryo-larvae observed after 36 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.10 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for mecoprop (MCP) (A), mecoprop-p (MCP-P) (B) and 2-methyl-4-chlorophenol (2-MCP) (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different. . . . 121

5.2	Occurrence of the various types of abnormalities affecting embryo-larval development in <i>C. gigas</i> after 36 h of herbicide exposure in relation to the concentrations of three chemicals : mecoprop (MCP) (A), mecoprop-p (MCP-P) (B) and 2-methyl-4-chlorophenol (2-MCP) (C). NOR : normal D-shaped larvae ; EMB : "old embryo" ; SHEL+MASH : D-shaped larvae exhibiting shell and/or hinge abnormalities (with/without additional mantle abnormality) ; MANT : D-shaped larvae with a hypertrophied mantle). . . . .	122
5.3	Light microscopy images (400x) showing (A) a normal D-shaped veliger and (B, C, D) D-shaped veligers showing increasingly severe shell abnormalities. . . . .	124
5.4	Net percentages of metamorphosed larvae (NPM <sub>e</sub> ) ( $\pm$ SEM) observed after 24 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.1 to 100,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for glyphosate and AMPA (A) or 10,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for mecoprop (MCP) and mecoprop-p (MCP-P) (A) and 2-methyl-4-chlorophenol (2-MCP) (B). The concentrations that do not share a letter are significantly different. . . . .	125
6.1	Vue en coupe de la structure expérimentale avec deux unités sur les sept présentes . . . .	143
6.2	Planche photographique représentant les deux structures utilisées pour l'exposition des juvéniles d'huîtres (A). Vue des juvéniles dans les unités d'exposition (B). Détail du système d'apport de microalgues (C). Vue des unités d'exposition et des tamis associés (D) et (E). . . . .	144
6.3	Planche photographique présentant le système de filtration mécanique et de stérilisation de l'eau de mer . . . . .	145
6.4	Planche photographique des cylindres de culture de microalgues. A) <i>Isochrysis galbana</i> et B) <i>Tetraselmis suecica</i> . . . . .	146
6.5	Plan d'échantillonnage des huîtres pour l'étude des différents biomarqueurs lors des expositions au glyphosate (exposition 1 en 2012), R <sub>EX</sub> et POEAs (exposition 2 en 2013). . . .	147
6.6	Schéma récapitulatif du protocole expérimental mis en place lors des différents temps de prélèvement. . . . .	148
6.7	Photographies de coupes histologiques présentant l'anatomie générale d'une huître en stade I (A) et en stade III (B). TD= tube digestif. Grossissement $\times 10$ . Photographies de coupes histologiques présentant l'aspect des tissus reproducteurs pour des individus en stade 0 (C) et en stade I (D) aux grossissements $\times 100$ et $\times 400$ . . . . .	151
6.7	Photographies de coupes histologiques présentant l'aspect des tissus reproducteurs pour : (E) des individus femelles en début de stade II (OVV = ovocytes en vitellotogenèse) ; (F) des individus femelles en stade II (OVG = ovogonies, OSM = ovocyte sub-mature, OVM = ovocyte mature) ; (G) des individus mâles en début de stade II (SPG = spermatogonies, SPC = spermatocytes) et (H) des individus mâles en stade II (SPG = spermatogonies, SPC = spermatocytes, SPT = spermatides, SPZ = spermatozoïdes). Grossissements $\times 100$ et $\times 400$ . 152	
6.8	Photographies de coupes histologiques illustrant en (A) l'absence et en (B) un très fort niveau (4) d'atrophies de la paroi des tubules de la glande digestive. Grossissements $\times 40$ et $\times 100$ . . . . .	153

6.9	Photographies de coupes histologiques illustrant en (A) l'absence et en (B) un très fort niveau (4) d'infiltrations hémocytaires. Grossissements $\times 40$ et $\times 100$ . . . . .	153
6.10	Photographies de coupes histologiques illustrant en (A) l'absence et en (B) un très fort niveau (4) de déstructurations du tissu conjonctif. Grossissements $\times 40$ et $\times 100$ . . . . .	154
6.11	Évolution de la taille des huîtres (moyennes $\pm$ SEM) exposées au glyphosate, Roundup Express® et POEAs. Les résultats sont exprimés en % de la taille des individus au début de l'exposition (T0). La taille moyenne des individus à T0 est de 24,54 mm $\pm$ 2,28 pour l'exposition au glyphosate et de 28,35 mm $\pm$ 3,74 pour l'exposition aux R <sub>EX</sub> et POEAs. Exposition au glyphosate $\Rightarrow$ Individus témoins à T0 : n= 74, T7 jours : n= 58, T14 jours : n= 46, T28 jours n= 34, T56 jours n= 8 ; Individus par concentration à T0 : n= 148, T7 jours : n= 115, T14 jours : n= 91, T28 jours n= 67, T56 jours n= 16. Exposition au R <sub>EX</sub> et POEAs $\Rightarrow$ Individus par concentration (dont témoins) à T0 : n=120 , T7 jours : n= 88 , T14 jours : n= 64 , T35 jours n= 39. . . . .	161
6.12	Évolution du poids (moyennes $\pm$ SEM) des huîtres exposées au glyphosate, Roundup Express® et POEAs. Les résultats sont exprimés en % du poids des individus au début de l'exposition (T0). Exposition au glyphosate $\Rightarrow$ Individus témoins à T0 : n= 74, T7 jours : n= 58, T14 jours : n= 46, T28 jours n= 34, T56 jours n= 8 ; individus par concentration à T0 : n= 148, T7 jours : n= 115, T14 jours : n= 91, T28 jours n= 67, T56 jours n= 16. Exposition au R <sub>EX</sub> et POEAs $\Rightarrow$ Individus par concentration (dont témoins) à T0 : n=120 , T7 jours : n= 88 , T14 jours : n= 64 , T35 jours n= 39. . . . .	162
6.13	Évolution de l'indice de condition AFNOR (moyennes $\pm$ SEM) des huîtres exposées au glyphosate, Roundup Express® et POEAs. Les résultats sont exprimés en % du poids des individus au début de l'exposition (T0). Exposition au glyphosate $\Rightarrow$ Individus témoins à T14, 28, 56 jours : n= 8 ; individus par concentration à T14, 28, 56 jours : n= 24. Exposition au R <sub>EX</sub> et POEAs $\Rightarrow$ T0, T7 jours, T14 jours : n= 24 pour toutes les conditions ; T35 jours : n= 39. . . . .	163
6.14	Stades de développement gamétogénétique observés en début et fin d'expérience (A) et proportion d'individus mâles et femelles après 56 jours d'exposition au glyphosate pour l'ensemble des conditions (B). Pour les stades de gamétogénèse : $13 < n < 29$ , pour le sexe ratio n= 76. . . . .	164
6.15	Stades de développement gamétogénétique observés en début et fin d'expérience (A) et proportion d'individus mâles et femelles après 35 jours d'exposition au R <sub>EX</sub> et POEAs pour l'ensemble des conditions (B). Pour les stades de gamétogénèse $8 < n < 30$ , pour le sexe ratio n= 77. Les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à $p < 0,05$ . . . . .	165
6.16	Niveaux (moyennes $\pm$ SEM) d'atrophies de la paroi des tubules de la glande digestive (A), de déstructurations du tissu conjonctif (B) et infiltrations hémocytaires (C) chez les huîtres à T0 et après 56 jours d'exposition au glyphosate. T0 : n= 33 ; témoins : n= 13 ; individus exposés : n= 25. Les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à $p < 0,05$ . . . . .	166

6.17	Niveaux (moyennes $\pm$ SEM) d'atrophies de la paroi des tubules de la glande digestive (A), de déstructurations du tissu conjonctif (B) et infiltrations hémocytaires (C) chez les huîtres en début (T0) et après 35 jours d'exposition au R <sub>EX</sub> et au POEAs. T0 : n= 29 ; témoins : n= 10 ; individus exposés : 7 < n < 15. Les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à p < 0,05. . . . .	167
6.18	Activités des catalases et GSTs et niveaux de MDA (moyennes $\pm$ SEM) chez les individus à T0, T24h, T7 jours et T14 jours après exposition aux R <sub>EX</sub> et POEAs. Activités catalases et GSTs : n= 6 pour chaque condition. MDA : n= 5 . . . . .	169
6.19	Niveaux d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les MT1 & 2 après 24h (A), 7 jours (B), 14 jours (C) d'exposition au glyphosate et pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins n= 4, exposés n= 8. La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à p < 0,05 . . . . .	171
6.20	Niveaux d'expression transcriptionnelle du gène codant pour la GST après 24h d'exposition au glyphosate pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins n= 4, exposés n= 8. La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à p < 0,05. . . . .	172
6.21	Niveaux d'expression transcriptionnelle du gène codant pour la MXR après 28 jours d'exposition au glyphosate pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins n= 4, exposés n= 8. La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à p < 0,05. . . . .	173
6.22	Niveaux d'expression transcriptionnelle du gène codant pour la HSC72 après 28 jours d'exposition au glyphosate pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins n= 4, exposés n= 8. La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à p < 0,05. . . . .	173
7.1	Schéma récapitulatif de l'ensemble des résultats obtenus pour les différents paramètres étudiés lors de la thèse. . . . .	190
A.1	Moyenne ( $\pm$ SEM) de la fluorescence des cellules (en % du témoin) représentant la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène après exposition pendant 72h au glyphosate (A), Roundup Express® (B) et aux POEAs (C) . . . . .	244
B.1	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>HSC72</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : p < 0.05). . . . .	246

B.2	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>HSP70</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	247
B.3	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>HSP90</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	248
B.4	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>CYP450</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	249
B.5	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>P53</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	250
B.6	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>SOD</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	251
B.7	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>MT1 &amp; 2</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	252
B.8	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>GST</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	253
B.9	Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. <b>MXR</b> normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests <i>post hoc</i> : $p < 0.05$ ). . . . .	254



# Table des matières

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>3</b>
1.1	Contexte et présentation du projet CHRONEXPO . . . . .	3
1.1.1	Contexte général . . . . .	3
1.1.2	Présentation du projet CHRONEXPO . . . . .	5
1.2	Modèles d'étude : l'ormeau, <i>Haliotis tuberculata</i> et l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> . . . . .	7
1.2.1	L'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i> . . . . .	7
1.2.2	L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> . . . . .	10
1.3	La conchyliculture . . . . .	14
1.3.1	L'aquaculture mondiale . . . . .	14
1.3.2	L'halioticulture . . . . .	15
1.3.3	L'ostréiculture . . . . .	15
1.4	Aspects réglementaires et synthèse sur la contamination des milieux aquatiques . . . . .	19
1.4.1	Aspects réglementaires : Convention OsPar, DCE, DCSMM, REACH, réglementation sur les pesticides . . . . .	19
1.4.2	Biosurveillance . . . . .	20
1.4.3	Contamination des milieux aquatiques estuariens et côtiers . . . . .	21
1.4.4	Cas des pesticides . . . . .	27
1.5	Effets des pesticides sur les mollusques marins . . . . .	34
1.5.1	Insecticides . . . . .	35
1.5.2	Fongicides . . . . .	36
1.5.3	Herbicides et algicides . . . . .	37
1.5.4	Mélanges de pesticides . . . . .	38
1.6	Biomarqueurs utilisés dans la thèse . . . . .	38
1.6.1	Approche <i>in vitro</i> . . . . .	38
1.6.2	Approche <i>in vivo</i> : tests embryo-larvaires . . . . .	43
1.6.3	Approche <i>in vivo</i> : biomarqueurs étudiés lors des expositions subchroniques . . . . .	44
1.7	Objectifs de la thèse . . . . .	49

## II Approche *in vitro* :

## effets d'herbicides sur les paramètres hématocytaires d'*Haliotis tuberculata* 53

<b>2</b>	<b><i>In vitro</i> effects of glyphosate-based herbicides and related adjuvants on haemocytes from <i>Haliotis tuberculata</i>.</b>	<b>57</b>
2.1	Introduction . . . . .	57
2.2	Materials and methods . . . . .	59
2.2.1	Haemocyte primary culture . . . . .	59
2.2.2	Studied endpoints . . . . .	60
2.2.3	Exposures to chemicals . . . . .	61
2.2.4	Statistical analyses . . . . .	61
2.3	Results . . . . .	62
2.3.1	MTT viability assay . . . . .	62
2.3.2	Neutral red retention assay (NRRA) . . . . .	62
2.3.3	Phagocytic activities . . . . .	63
2.4	Discussion . . . . .	64
2.5	Conclusion . . . . .	68

## III Approche *in vivo* : tests embryo-larvaires 71

<b>3</b>	<b>Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i>.</b>	<b>77</b>
3.1	Introduction . . . . .	78
3.2	Materials and methods . . . . .	82
3.2.1	Chemical compounds . . . . .	82
3.2.2	Embryotoxicity bioassay and experimental design . . . . .	82
3.2.3	Metamorphosis bioassay and experimental design . . . . .	84
3.2.4	Statistical analysis . . . . .	86
3.3	Results . . . . .	87
3.3.1	Analyses of the tested molecules . . . . .	87
3.3.2	Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development . . . . .	88
3.3.3	Effects of glyphosate-based herbicides on larval metamorphosis . . . . .	90
3.4	Discussion . . . . .	92
3.4.1	Concentrations of chemicals and their dynamics . . . . .	92
3.4.2	Effects of glyphosate-based herbicides on larval metamorphosis versus embryo-larval development . . . . .	94
3.4.3	Effects of various contaminants on the embryo-larval development of marine bi-valve species . . . . .	95
3.4.4	Sensitivity of various aquatic species to glyphosate and AMPA . . . . .	98
3.4.5	Comparison of the effects of glyphosate/AMPA and Roundup® formulations . . . . .	98



3.4.6	Level of contamination of aquatic ecosystems by glyphosate-based herbicides and perspectives . . . . .	99
3.5	Conclusion . . . . .	100
<b>4</b>	<b>Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200®) on two life stages of the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i>.</b>	<b>103</b>
4.1	Introduction . . . . .	104
4.2	Materials and methods . . . . .	104
4.3	Results . . . . .	106
4.4	Discussion and conclusion . . . . .	108
<b>5</b>	<b>Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i>.</b>	<b>111</b>
5.1	Introduction . . . . .	112
5.2	Materials and methods . . . . .	116
5.2.1	Chemical compounds . . . . .	116
5.2.2	Embryotoxicity bioassay and experimental design . . . . .	117
5.2.3	Metamorphosis bioassay and experimental design . . . . .	118
5.2.4	Statistical analyses . . . . .	118
5.3	Results . . . . .	119
5.3.1	Analyses of the tested molecules . . . . .	119
5.3.2	Embryotoxic effects of herbicides . . . . .	119
5.3.3	Effects of herbicides on larval metamorphosis . . . . .	121
5.4	Discussion . . . . .	123
5.4.1	Concentrations of chemicals and their dynamics . . . . .	123
5.4.2	Effects of mecoprop and herbicide mixtures including mecoprop on aquatic animals	124
5.4.3	Effects of various contaminants on the embryo-larval development in <i>C. gigas</i> . . .	128
5.4.4	Comparison between different endpoints . . . . .	129
5.5	Conclusion . . . . .	132
<b>IV</b>	<b>Approche <i>in vivo</i> : expositions subchroniques</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Effets des expositions subchroniques au glyphosate, Roundup® et POEAs chez des juvéniles de <i>Crassostrea gigas</i></b>	<b>137</b>
6.1	Introduction . . . . .	137
6.2	Matériel et méthodes . . . . .	141
6.2.1	Plan expérimental et présentation des structures d'exposition . . . . .	141
6.2.2	Histologie . . . . .	146
6.2.3	Mesure de la peroxydation lipidique et de l'activité enzymatique des catalases et GSTs . . . . .	155
6.2.4	Mesure de l'expression transcriptionnelle de gènes cibles : technique de PCR en Temps Réel (RT-PCR) . . . . .	157

6.3	Résultats . . . . .	160
6.3.1	Mortalité et croissance . . . . .	160
6.3.2	Sexe et stade de gamétogenèse . . . . .	163
6.3.3	Qualité des tissus évaluée par histopathologie . . . . .	165
6.3.4	Activités des GSTs et des catalases ; peroxydation lipidique . . . . .	167
6.3.5	Mesure de l'expression transcriptionnelle de gènes ciblés évaluée par RT-PCR . . .	170
6.4	Discussion . . . . .	174
6.4.1	Concentrations des molécules dans les structures expérimentales . . . . .	174
6.4.2	Niveaux d'expression des gènes ciblés . . . . .	174
6.4.3	Activités enzymatiques et peroxydation lipidique . . . . .	178
6.4.4	Reproduction : stades de gamétogenèse . . . . .	180
6.4.5	Histopathologie . . . . .	182
6.4.6	Croissance . . . . .	183
6.5	Conclusion . . . . .	185
<b>V</b>	<b>Conclusion générale-perspectives</b>	<b>187</b>
<b>7</b>	<b>Conclusion générale-perspectives</b>	<b>189</b>
7.1	Biomarqueurs et stades de vie étudiés . . . . .	191
7.2	Herbicides chlorophénoxylés et molécule apparentée (2-MCP) . . . . .	193
7.3	Glyphosate et composés apparentés (AMPA, formulations commerciales et adjuvants) . .	195
7.4	Synthèse sur la toxicité des différents composés testés sur <i>C. gigas</i> et <i>H. tuberculata</i> . . . .	200
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>205</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>240</b>
<b>A</b>	<b>Mesure des dérivés réactifs de l'oxygène par cytométrie en flux</b>	<b>243</b>
<b>B</b>	<b>Ensemble des données de mesure de l'expression transcriptionnelle de gènes cibles.</b>	<b>245</b>
<b>C</b>	<b>Contributions scientifiques</b>	<b>255</b>
C.1	Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture . . . . .	255
C.2	Communications affichées . . . . .	279

## **Première partie**

### **Introduction**



# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 Contexte et présentation du projet CHRONEXPO

#### 1.1.1 Contexte général

La prise de conscience de l'impact potentiel des polluants sur l'environnement a donné naissance à l'écotoxicologie dans les années 1970. Cette discipline, à l'interface de la toxicologie et de l'écologie, vise à étudier l'effet des contaminants sur l'ensemble des êtres vivants. Depuis la révolution industrielle, le nombre de produits chimiques (produits manufacturés par l'homme) est en constante augmentation. Ainsi en juin 2013, le nombre de produits chimiques différents recensés dans la base de données CAS (Chemical Abstract Service) dépassait les 73 000 000 (Chemical Abstract Service, 2013).

Les environnements côtiers, estuariens et marins sont particulièrement soumis à la pression des activités humaines. De nos jours, les Nations Unies estiment que 80% de la population mondiale vit dans une bande littorale de 100 kilomètres de large et huit des dix plus grandes agglomérations mondiales y sont localisées (Tokyo, New York, Séoul, São Paulo, Los Angeles, Djakarta, Le Caire et Bombay) (Olivier, 2008). Les fortes densités de population peuvent participer à la libération directe dans le milieu marin de macro-déchets. En dépit de la présence de Stations d'Épurations (STEPs), de nombreux contaminants émergents, directement liés aux activités humaines, sont retrouvés dans les eaux de surface : résidus pharmaceutiques, xéno-oestrogènes, produits cosmétiques... Bien qu'une amélioration globale de la qualité de traitement des STEP s'observe depuis les années 1990, il arrive encore que leurs capacités soient dépassées lors des périodes estivales, participant ainsi à la libération de polluants dans

l'environnement. En plus des fortes densités de population, la bande côtière accueille également de nombreux complexes industrialo-portuaires qui peuvent libérer divers polluants tels que les métaux, Poly-Chloro-Biphenyls (PCBs), Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), radionucléides... Si aujourd'hui 20% de la pollution du milieu marin a pour origine les activités en mer, le Programme des Nations Unies pour l'environnement estime que 80% de ces pollutions proviennent des apports telluriques via les fleuves ou par ruissellement et déversement à partir des zones côtière (Colas, 2011). Le problème de la qualité des eaux côtières et marines est donc majoritairement lié aux activités humaines bien en amont des zones littorales. Par exemple, les pesticides utilisés en agriculture sont d'abord retrouvés dans les réseaux hydrographiques via le ruissellement ou le lessivage des sols pour devenir finalement des contaminants des zones littorales (Buisson *et al.*, 2008; Burgeot *et al.*, 2008).

La mer de la Manche (English Channel) borde l'océan Atlantique et s'ouvre au Nord sur la mer du Nord. Sa largeur varie entre 180 km dans la partie située la plus à l'ouest et 34 km au niveau du détroit du Pas-de-Calais et sa profondeur ne dépasse pas 120 mètres. C'est l'une des zones maritimes les plus fréquentées du monde et plus de 20% du trafic mondial y transite chaque année.

Du côté du Royaume-Uni, le Channel reçoit l'apport de nombreux cours d'eau dont les plus importants sont : la Tamar, l'Exe, l'Avon et l'Arun. La contamination des zones côtières par les apports terrigènes est effective et les études font état de la pollution par des composés organochlorés tel que les PCBs, les dioxines ou les furanes (Fox *et al.*, 2001; Danis *et al.*, 2006), par des métaux (Statham *et al.*, 1999) ou encore par des pesticides (Fox *et al.*, 2001).

Du côté français, la Manche reçoit les eaux des bassins de la Somme, ainsi que celles des fleuves côtiers de Normandie (Orne), de Bretagne septentrionale (Rance) mais un des apports les plus importants en eau douce provient de la Seine. Le bassin versant de la Seine s'étend sur une surface de plus de 79 000 km<sup>2</sup> ( $\approx$  14% du territoire français) et concentre 16 millions d'habitants (26% de la population française) (Guézennec *et al.*, 1999). Ce territoire regroupe, selon les estimations, de 30 à 40% des activités économiques et agricoles de la France dont 50% du trafic fluvial et 33% des activités de raffinage (Guézennec *et al.*, 1999; Cachot *et al.*, 2006; Meybeck *et al.*, 2007). La Seine et son estuaire font partie des masses d'eau les plus polluées de la planète et, de part les activités précédemment évoquées, elles ont reçu depuis de nombreuses années des apports variés et importants en micro-polluants. Ainsi diverses études font état de

la contamination par les HAPs (Fernandes *et al.*, 1997; Carpentier *et al.*, 2002; Cachot *et al.*, 2006; Motelay-Massei *et al.*, 2007), les PCBs (Chevreuil *et al.*, 1995, 1996; Carpentier *et al.*, 2002; Meybeck *et al.*, 2007), les métaux (Chevreuil *et al.*, 1995, 1996; Grosbois *et al.*, 2006; Meybeck *et al.*, 2007) ou encore les pesticides (Chevreuil *et al.*, 1995, 1996; Bouland *et al.*, 2010). D'autres types de pollutions moins "classiques" sont aussi à considérer en Manche ; par exemple, l'industrie nucléaire participe au rejet de très faibles concentrations en radionucléides dans l'environnement (Farcy, 2006). Par ailleurs, les résidus pharmaceutiques constituent une classe de polluants émergents qui peuvent être retrouvés dans l'estuaire de la Seine à des teneurs de plusieurs centaines de nanogrammes (Budzinski et Forget-Leray, 2008).

L'effet des différents contaminants sur les environnements de la Manche a été particulièrement étudié depuis le lancement du programme Seine Aval en 1995 et de nombreuses recherches ont été réalisées *in situ* et *ex situ* (Guézennec *et al.*, 1999). Les contaminations auxquelles peuvent être soumis les organismes de la Manche diffèrent au niveau du type et du mode d'action. Ainsi, si ces organismes peuvent être soumis à des pollutions de type aiguë (accidents, pics de pollution), l'effet des contaminations chroniques est beaucoup moins étudié et beaucoup plus difficile à appréhender (coût des expérimentations, nécessité de disposer d'avoir des biomarqueurs sensibles...). Le manque de données relatives à la contamination chronique a motivé le lancement du projet Européen CHRONEXPO.

### 1.1.2 Présentation du projet CHRONEXPO

Le projet CHRONEXPO (CHRONic EXPOsure)(2010-2014) est soutenu par le programme INTERREG IVA trans-Manche. Ce projet est piloté par le docteur Bruno Fiévet de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) de Cherbourg-Octeville. Ce projet a pour but "*d'étudier les conséquences de l'exposition chronique des espèces marines aux polluants générés par l'homme*". CHRONEXPO regroupe plusieurs équipes de scientifiques en France et au Royaume-Uni : Université de Plymouth, Center for Environment Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS) de Weymouth, Université de Portsmouth, Université de Caen et IRSN de Cherbourg. Ces équipes de recherche étudient différentes espèces animales présentant un intérêt économique : la seiche, *Sepia officinalis* ; l'ormeau, *Haliotis tuberculata* ; la moule, *Mytilus ssp.* ; l'huître creuse, *Crassostrea gigas* et le polychète, *Alitta virens*. Ces organismes sont exposés à différents types de polluants tels que les métaux lourds, les radionucléides et les pesticides. Les effets de ces contaminants sont étudiés à différents niveaux d'organisation du vivant, depuis

l'individu jusqu'à l'échelle moléculaire. Les modèles et les contaminants étudiés par l'ensemble des partenaires du projet CHRONEXPO sont résumés dans la figure 1.1.

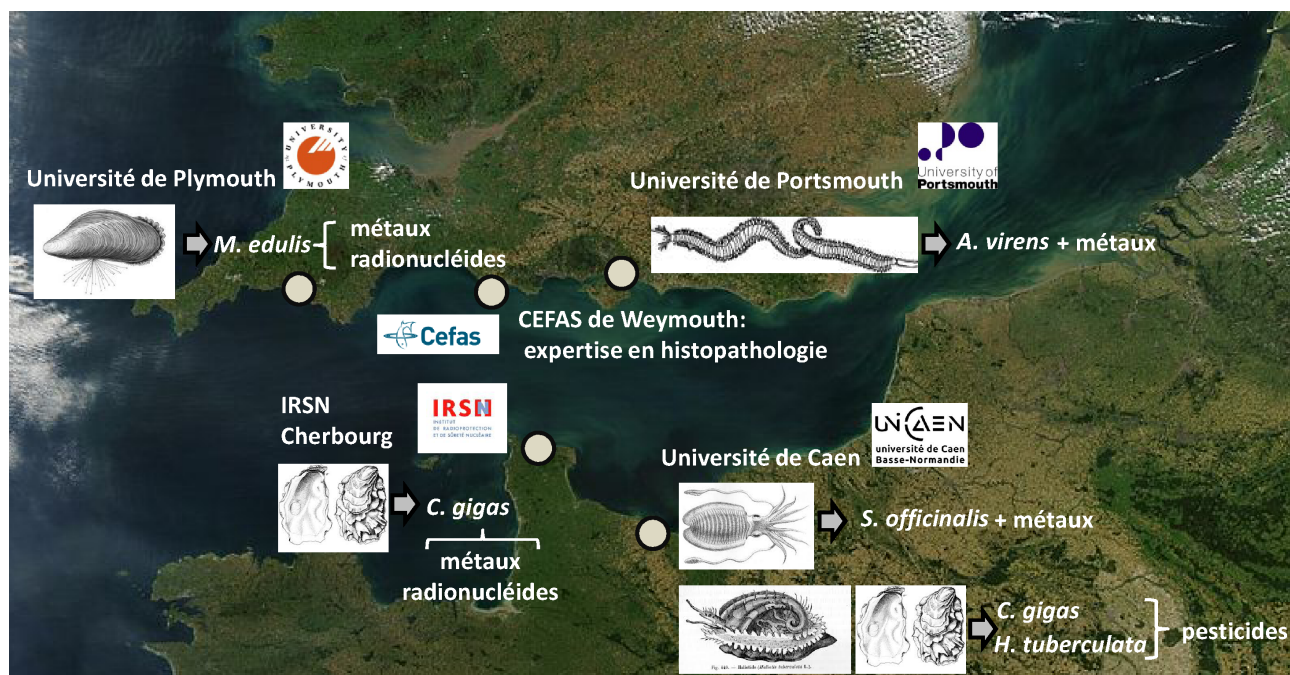


FIGURE 1.1 – Espèces animales et types de contaminants étudiés par les partenaires impliqués dans le projet CHRONEXPO.



## 1.2 Modèles d'étude : l'ormeau, *Haliotis tuberculata* et l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Les mollusques font partie du règne des Métazoaires et du sous-règne des Eumétazoaires. Ceux sont des Triploblastiques, Bilatéraux, Protostomiens et Lophotrochozoaires qui se caractérisent par un stade larvaire de type trochophore. Avec de 50 000 à 120 000 espèces selon les estimations, l'embranchement des mollusques (Mollusca) est le deuxième plus important parmi les Eumétazoaires après celui des arthropodes. Huit classes différentes composent cet embranchement, avec notamment celle des gastéropodes (Gastropoda) composée de 75 000 espèces, et celle des bivalves (Bivalvia) formée de 9200 espèces (Figure 1.2).

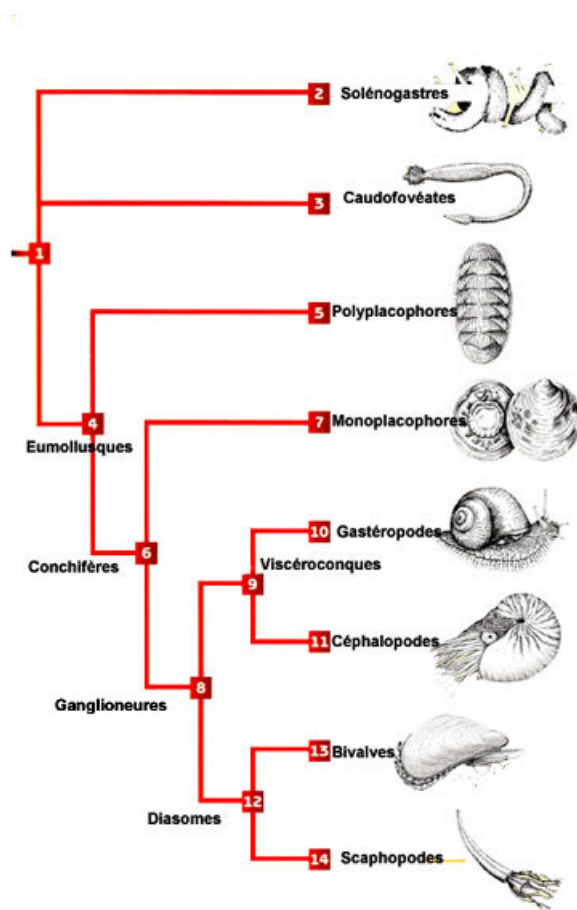


FIGURE 1.2 – Classification des mollusques. D'après Lecointre et Le Guyader (2006).

### 1.2.1 L'ormeau *Haliotis tuberculata*

#### Classification

L'ormeau *Haliotis tuberculata* appartient au sous-ordre des prosobranches (branchies situées en avant du cœur) ; sa position systématique est résumée dans le tableau 1.1

TABLE 1.1 – Position systématique de l’ormeau, *H. tuberculata*

	<i>Haliotis tuberculata</i>
Embranchement	Mollusca
Classe	Gasteropoda (Cuvier, 1797)
Ordre	Archeogastropoda (Thiele, 1925)
Super-Famille	Haliotidea (Rafinesque, 1815)
Famille	Haliotidae (Rafinesque, 1815)
Genre	Haliotis (Linné, 1758)
Espèce	tuberculata (Linné, 1758)

### Répartition géographique

L’espèce *Haliotis tuberculata* est présente uniquement en Europe et en Afrique du nord. Elle se répartit du Sénégal à l’Irlande et est recensée sur l’ensemble du bassin Méditerranéen (variété *lamellosa*) (Le Petit, 2009).

### Mode de vie

L’ormeau *Haliotis tuberculata* est une espèce de gastéropode lucifuge vivant dans les anfractuosités des rochers de la zone infralittorale jusqu’à une profondeur de 13 mètres (Clavier et Richard, 1986; Hayward et Ryland, 1995). Ces animaux sont des brouteurs qui, à l’âge adulte, se nourrissent de macroalgues brunes, rouges ou vertes grâce à leur radula que l’on qualifie de rhipidoglosse chez *H. tuberculata* (dents nombreuses mais absence de soies). Les phases les plus jeunes se nourrissent de diatomées et d’algues microscopiques qui sont fixées sur le substrat tandis que les juvéniles consomment des algues encroûtantes (ex : *Lithothamnium ssp.*).

### Anatomie

La coquille de l’ormeau est constituée de deux couches différentes : la couche interne est nacrée et composée de tablettes aragonitiques alors que la couche externe est composée de prismes de calcite (Fleury *et al.*, 2008). La coquille est perforée d’une série de 4 à 5 pores par lesquels sort l’eau qui a circulé dans la cavité palléale afin de permettre l’oxygénation (Bevelander, 1988). Le corps de l’ormeau est constitué de tissus mous et tous les organes s’organisent autour de la cavité palléale. L’anatomie de l’ormeau est détaillée dans la figure 1.3 ; la coquille est reliée au reste des tissus par un muscle columellaire tandis que le pied (sole pédieuse) permet à l’animal de se fixer au support.

Le système nerveux est considéré comme primitif avec la présence de ganglions très peu différenciés. L’appareil circulatoire est composé d’un cœur à deux oreillettes et

un ventricule entourés d'un péricarde, d'un réseaux d'artères et de veines sur le trajet desquelles on retrouve les deux reins (caractère primitif) et les branchies qui vont permettre d'épurer puis d'oxygéner l'hémolymphe. Le système digestif est constitué d'une cavité buccale en arrière de laquelle se trouve le bulbe radulaire. Celui-ci débouche postérieurement sur l'œsophage qui se poursuit jusqu'à l'estomac dans lequel se situent deux conduits provenant des deux lobes de la glande digestive. Entre l'estomac et l'anus, l'intestin forme de nombreuses anses avant de se transformer en un rectum en traversant le cœur.

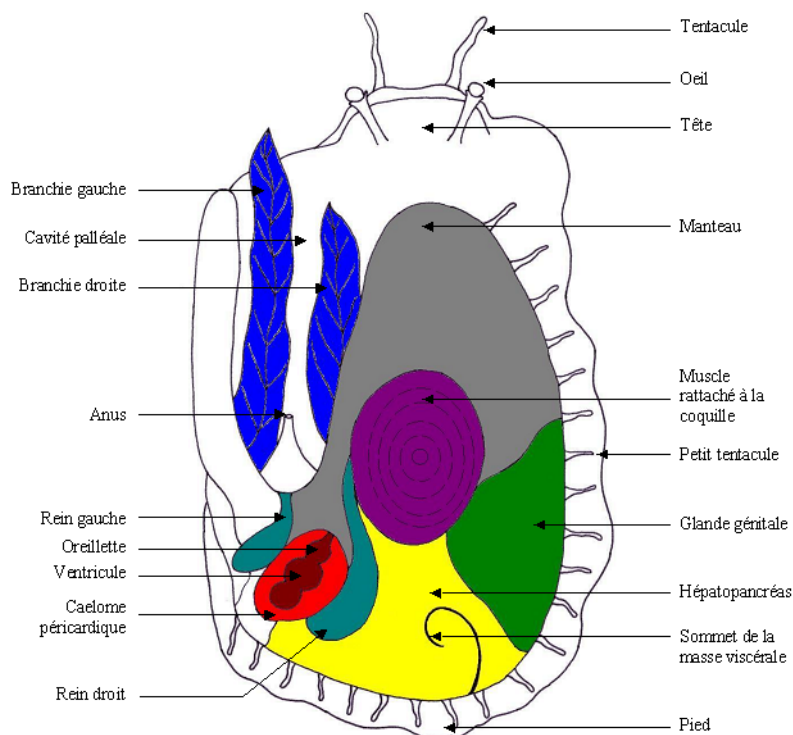


FIGURE 1.3 – Schéma de la face dorsale d'*Haliotis tuberculata* sans la coquille. D'après Le Petit (2009).

### Reproduction et développement

Chez *H. tuberculata*, la fécondation est externe et s'effectue en pleine mer. Bien qu'il n'existe pas de caractères morphologiques externes pour les différencier, les sexes sont séparés (espèce dioïque). Cependant, certains cas rares d'hermaphrodisme juvénile successif (jusqu'à la 3<sup>e</sup> année) ont été rapportés (Le Petit, 2009). La maturité sexuelle est atteinte à l'âge de 2 ans pour les mâles et au cours de la 3<sup>e</sup> année pour les femelles. L'évolution des différents stades larvaires est détaillée dans la figure 1.4. Après fécondation en pleine mer, l'embryon se divise rapidement et atteint le stade morula (2h50 Post Fécondation : PF). L'embryon évolue ensuite en larve trochophore (4h40-4h50 PF) qui éclot à 6h PF. A 11h PF, la larve trochophore se transforme en larve véligère chez la-

quelle apparait la coquille. La larve véligère tombe et se fixe au fond entre 43 et 46h PF (stade benthique). Après une quinzaine de jours, les individus sont considérés comme étant des juvéniles.

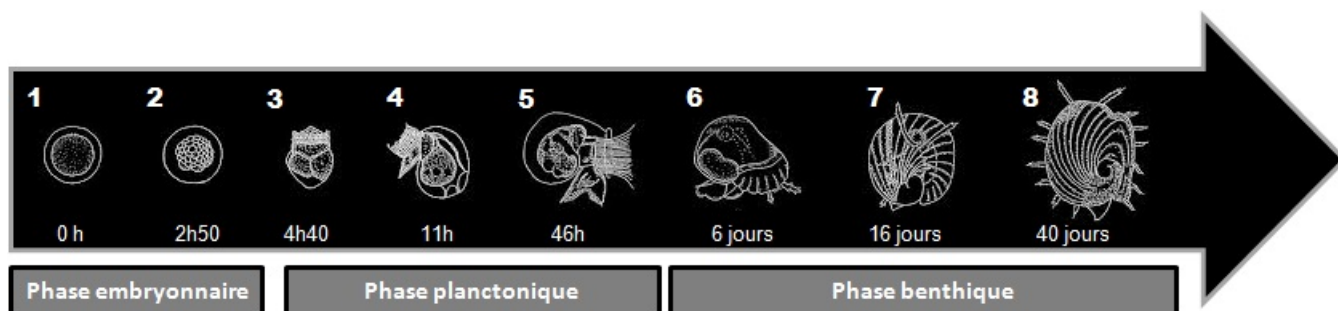


FIGURE 1.4 – Développement de l'ormeau *Haliotis tuberculata*. 1 : oeuf ; 2 : stade morula ; 3 : larve trochophore ; 4 : larve véligère après éclosion ; 5 : larve véligère à la fin du stade planctonique ; 6-7 : larve benthique ; 8 : juvénile

### 1.2.2 L'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) appartient à l'ordre des Filibranches (présence de mésobranchies)(Tableau 1.2).

TABLE 1.2 – Position systématique de l'huître creuse, *C.gigas*

	<i>Crassostrea gigas</i>
Embranchement	Mollusca
Classe	Bivalvia (Linné, 1758)
Ordre	Filibranchia (Woodward, 1892)
Super-Famille	Ostreioidea (Rafinesque, 1815)
Famille	Ostreidae (Rafinesque, 1815)
Genre	<i>Crassostrea</i> (Sacco, 1897)
Espèce	<i>gigas</i> (Thunberg, 1793)

#### Répartition géographique

Originnaire du Pacifique, l'huître creuse *Crassostrea gigas* est présente en Europe, de l'Irlande jusque dans le bassin Méditerranéen. Elle a été introduite en France à partir de la fin des années 1960 (géniteurs originaires du Canada et naissain provenant du Japon) afin de remplacer l'huître Portugaise, *Crassostrea angulata*, dont les stocks s'étaient effondrés suite à deux maladies d'origine virale (Renault, 2006). Différentes caractéristiques telles que sa faculté de vivre en milieux saumâtres (euryhalinité) et, de manière plus générale, son euryécie, sa fécondité importante ainsi que le relatif manque "d'ennemis naturels" ont fait de *C. gigas* une espèce invasive dans certaines régions de l'Europe du Nord où elle peut former de véritables récifs (Schmidt *et al.*, 2008).

### Mode de vie

Les huîtres sont des animaux sessiles qui se répartissent dans toute la zone intertidale et subtidale, à partir des zones découvertes aux faibles coefficients (40). Les adultes vivent fixés sur des substrats durs tels que les rochers, des débris ou d'autres coquilles. Ce sont des filtreurs microphages se nourrissant principalement de tripton, bactéries, phytoplancton et phytobenthos remis en suspension. Leur taux de filtration sont élevés et peuvent atteindre 7,8 à 10,23 L h<sup>-1</sup> (Hamon et Tournier, 1984).

### Anatomie

La masse viscérale des huîtres est entourée d'un manteau possédant plusieurs fonctions (sécrétion de la coquille, fonctions sensorielles ...) puis d'une coquille constituée de deux valves inégales. La coquille de l'huître creuse se compose uniquement de calcite et comporte trois couches distinctes : le myostracum (couche prismatique), la couche foliée et du côté le plus interne, la couche crayeuse (Lartaud *et al.*, 2006).

La masse viscérale est notamment constituée de deux paires de branchies, du muscle adducteur et de quatre palpes labiaux qui entourent la bouche (Figure 1.5). Le système digestif des huîtres est composé d'une bouche prolongée par un œsophage court, d'un estomac entièrement entouré par la glande digestive tubulaire, d'un intestin et d'un rectum aboutissant à l'anus. Au niveau de l'estomac se trouve un cæcum contenant un stylet cristallin qui participe à la digestion en libérant différentes enzymes. Le système circulatoire des huîtres est semi-ouvert (ou lacunaire) et la collecte de l'hémolymphe s'effectue par des sinus veineux. Le cœur, enfermé dans la cavité péricardique, est formé de deux oreillettes et d'un ventricule. L'hémolymphe est propulsée à partir du ventricule dans les aortes postérieure et antérieure puis dans les artères et artérioles et enfin dans les lacunes qui s'infiltrent dans les organes. Le système nerveux, symétrique selon le plan sagittal, est composé antérieurement de trois paires de ganglions : les ganglions cérébroïdes, pleuraux et pédieux et, postérieurement, des ganglions intestinaux et viscéraux. Le système excréteur est formé d'une paire de reins (métanéphridies) situés sous le manteau et qui débouchent dans la cavité péricardique par l'intermédiaire d'un entonnoir cilié. La gonade est constituée de tubules qui se développent dans l'aire gonadique localisée entre la glande digestive et le manteau. Dans les tubules gonadiques, les cellules germinales évoluent de façon centripète lors de la gaméto-genèse.

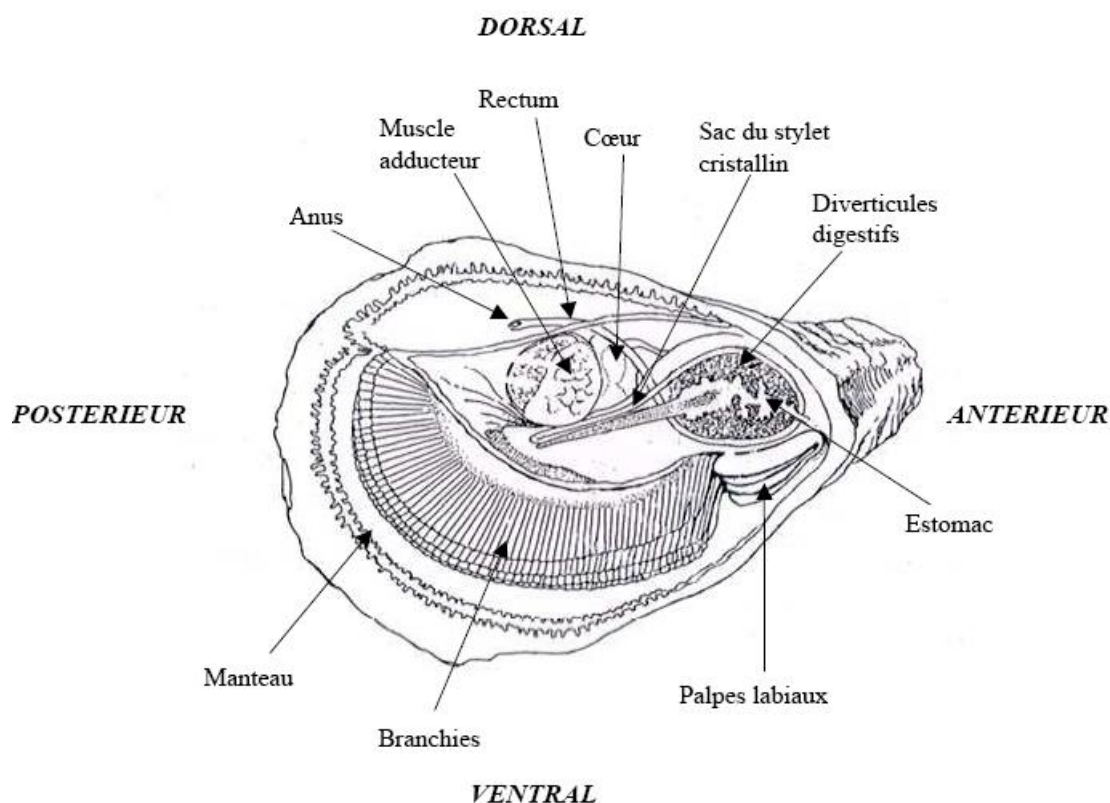


FIGURE 1.5 – Schéma de l'anatomie de l'huître creuse *C. gigas*. D'après Howard et Smith (1983).

### Reproduction et développement

Les huîtres sont des animaux qui présentent le plus souvent un hermaphrodisme successif à tendance protandrique (Buroker, 1983). En effet, les animaux sont généralement des mâles lors de leur première reproduction et le sexe des individus peut ou non changer d'un cycle de reproduction à l'autre. Il existe cependant un faible pourcentage (0.23% – 2.95%) d'individus possédant simultanément des gamètes mâles et femelles (Steele et Mulcahy, 1999). Le cycle de reproduction de *C. gigas* est caractérisé par 5 phases suivant un rythme saisonnier. La première phase dite de "repos sexuel" a lieu en Normandie en automne-hiver mais peut être très peu marquée, voire quasi-inexistante en Baie des Veys (Costil *et al.*, 2005). Lors de la 2<sup>e</sup> phase, la gamétogenèse reprend à partir des cellules germinales (mitoses goniales) à une période où le tissu de réserve (stockage du glycogène) est bien développé (Berthelin *et al.*, 2000). La gamétogenèse est particulièrement active au printemps lorsque les conditions environnementales sont favorables et cette 3<sup>e</sup> phase aboutit à la maturité sexuelle des huîtres qui présentent alors un aspect laiteux (4<sup>e</sup> phase). En France, la ponte (5<sup>e</sup> phase) a lieu de la fin du printemps à l'été en allant du sud vers le nord ; en Baie des Veys, elle est généralement atteinte en août. Dans ce bassin ostréicole, la fécondité d'huîtres de

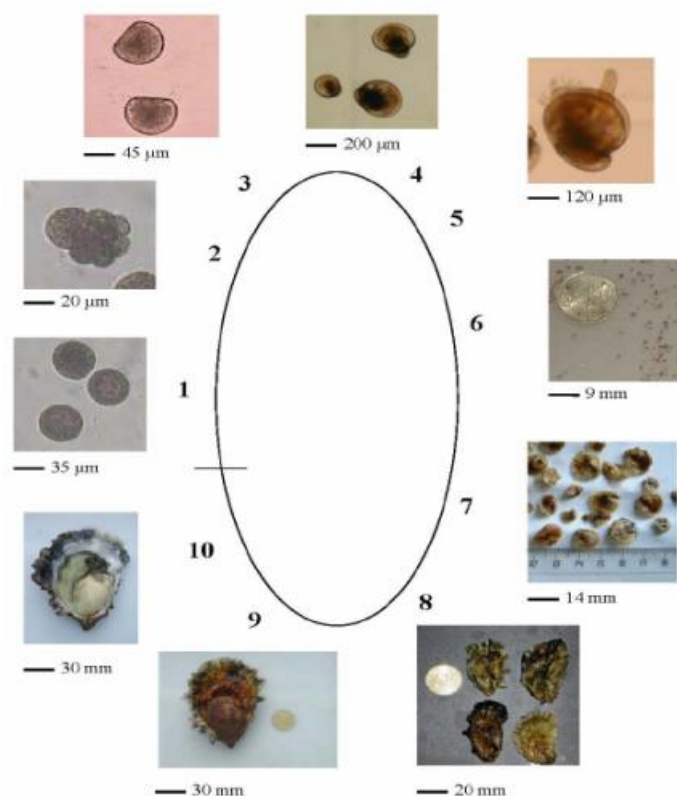


FIGURE 1.6 – Cycle biologique de l’huître creuse, *Crassostrea gigas*. 1. Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes. 2. Embryon au stade morula (2-3 heures). 3. Larves D (24 heures). 4. Larves véligères (14 jours). 5. Larve pédivéligère (18 jours). 6. Naissain post-fixation (1 mois). 7. Naissain (2 mois). 8. Naissain (6 mois). 9. Adulte (10 mois). 10. Géniteur mature (10 mois). (Remarque : l’âge indiqué pour les photos 7 à 10 est représentatif d’huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole). D’après Dégremont (2003).

demi-élevage et commercialisables a été estimée à, respectivement, 135 et 146 millions d’œufs (Royer *et al.*, 2008). La ponte intervient en réponse à des stimuli environnementaux tels qu’une augmentation de température ou un bloom phytoplanctonique. En Baie des Veys, la ponte est souvent partielle et peut se prolonger pendant toute la période estivale (Costil *et al.*, 2005). Les gamètes résiduels, non émis pendant période de la ponte, sont résorbés par cytolysse puis phagocytés par les hémocytes pendant l’automne.

La fécondation est externe avec la libération des spermatozoïdes et des ovocytes dans le milieu. Vingt-quatre heures après la fécondation, la larve trochophore se différencie en larve véligère (ou larve D) qui possède une coquille (prodissoconque) et dont le vélum assure les fonctions de nutrition et de locomotion (Figure 1.6). Après une vingtaine de jours de vie pélagique, la larve s’est progressivement transformée en larve pédivéligère qui possède un pied lui permettant de se fixer au substrat. Une fois fixée, la larve se métamorphose avec la résorption du pied et du vélum et le développement du muscle et des branchies (Baker et Mann, 1994). Après métamorphose l’huître



est qualifiée de naissain (Figure 1.6).

## 1.3 La conchyliculture

### 1.3.1 L'aquaculture mondiale

Les produits de la pêche font partie des denrées alimentaires de base les plus échangées au monde (FAO, 2013). Si les pêches de capture restent aujourd'hui stables, la production de l'aquaculture est en perpétuelle augmentation (Figure 1.7). En 2010, l'aquaculture mondiale représentait une production totale de 59,9 millions de tonnes avec un total de 18,1 millions de tonnes pour l'aquaculture en eau de mer (Figure 1.7) (FAO, 2013). Le principal producteur de produits aquacoles est le continent asiatique avec une production de 89% des ressources mondiales (53,3 millions de tonnes), suivi du continent Américain (4,30% : 2,6 millions de tonnes) et de l'Europe (4,20% : 2,5 millions de tonnes). En Europe, les 3 principaux producteurs de ressources aquacoles sont la Norvège (39,95% : 1 008 010 tonnes), l'Espagne (10% : 252 351 tonnes) et la France (8,89% : 224 400 tonnes) (FAO, 2013).

Les espèces cultivées en eau de mer sont principalement constituées de mollusques puisque ceux-ci représentent plus 75,5% de la production totale avec 13,9 millions de tonnes. Le reste de la production est composée de poissons (18,7%), de crustacés (3,8%) et d'autres animaux marins (2,1%) (FAO, 2013).

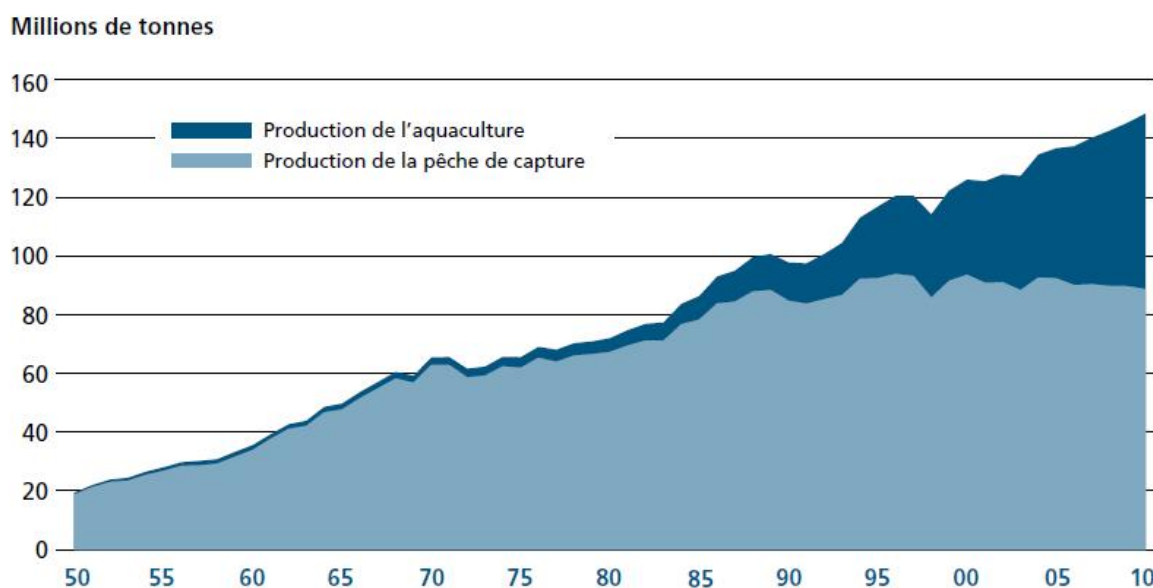


FIGURE 1.7 – Évolution de l'aquaculture mondiale en eaux douces et marines de 1950 à 2010. D'après FAO (2013).



### 1.3.2 L'halioticulture

#### Données de production

Bien qu'il existe une centaine d'espèces d'ormeaux dans le monde, seulement une dizaine d'entre elles sont consommées. Les données de pêches font état d'une baisse des captures dans le monde entre 1970 (environ 20 000 tonnes) et 2008 (8650 tonnes). Néanmoins, pendant la même période, la production d'ormeaux d'élevage est passée d'une proportion quasiment négligeable à plus de 30 760 tonnes (Cook et Gordon, 2010). L'élevage d'ormeaux connaît même une croissance exponentielle puisqu'en 2013 la production globale dépasse les 85 000 tonnes (Fishtech, 2013).

En France, les ormeaux *Haliotis tuberculata* sont des animaux qui sont traditionnellement pêchés (par les amateurs ou par les professionnels détenteurs d'une licence). De plus, depuis plusieurs années, une activité d'aquaculture s'est développée et une dizaine de tonnes sont produites annuellement (Travers, 2008).

#### Mortalités halioticoles

Que ce soit dans le milieu naturel ou en élevage, les ormeaux *H. tuberculata* présentent des épisodes de mortalités massives depuis la fin des années 1990. Ces mortalités ont été associées à une bactérie du genre *Vibrio* (*Vibrio harveyi*) et semblent impliquer des interactions au niveau de l'hôte, du pathogène et de l'environnement (Travers, 2008). Ainsi, Travers et ses collaborateurs (2009) ont montré que les mortalités apparaissent avec une température de l'eau supérieure à 17°C et que les animaux sont tout particulièrement sensibles lors des périodes de reproduction.

### 1.3.3 L'ostreïculture

#### Données de production et méthodes d'élevage

La production d'huîtres creuses dans le monde a connu une forte augmentation entre les années 1950 (149 163 tonnes) et 1988 (765 821 tonnes) ; elle s'est ensuite stabilisée entre les années 1990 et 2010 (661 500 tonnes) (FAO, 2013). En France, la production conchylicole est largement dominée par l'huître creuse *C. gigas* qui fluctuait entre 125 000 et 140 000 tonnes jusqu'à la première décennie des années 2000 (CNC, 2010). Selon les dernières données disponibles (2010-2011), la production de *C. gigas* est de 82 800 tonnes, soit 51% de la production totale des bivalves (158 000 tonnes) (CNC, 2010) (Figure 1.8). Les sites d'élevage d'huîtres creuses se répartissent sur l'ensemble des côtes françaises avec cependant des contributions inégales à la production ostréicole. Ainsi,

les régions Poitou-Charentes et Bretagne Nord représentent respectivement 24,2% et 22,9% de la production ostréicole totale (20 000 et 19 000 tonnes) ; la région Normandie contribue à 19,6% du total (16 200 tonnes) et le reste se répartit entre la Méditerranée (étang de Thau)(7600 tonnes), les régions Arcachon-Aquitaine et Pays de la Loire (7000 tonnes chacune) ainsi que la Bretagne Sud (6000 tonnes) (CNC, 2010) (Figure 1.8).

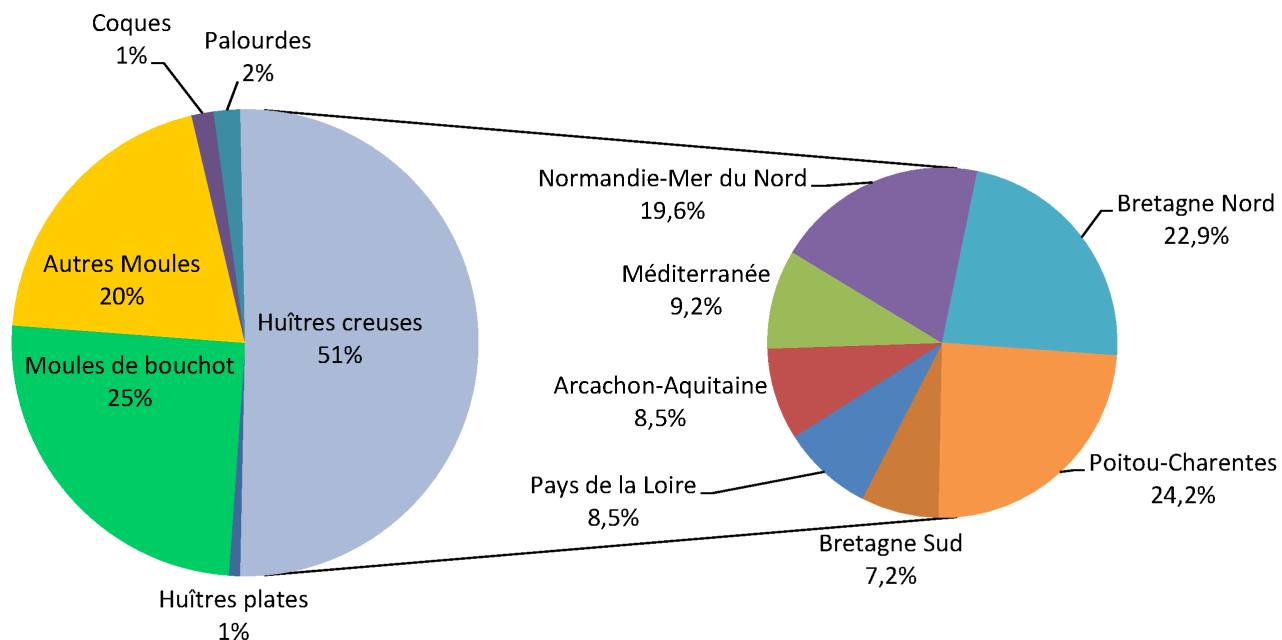


FIGURE 1.8 – Production conchylicole en France pour l'année 2010 et détail des régions productrices d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*

La culture de l'huître se pratique en milieu ouvert, *in natura*, ce qui permet aux bivalves de se nourrir en filtrant d'importantes masses d'eau. Le cycle de production se fait soit à partir de naissains d'écloserie, soit à partir de naissains captés dans le milieu naturel (Figure 1.9). Dans ce dernier cas, le naissain fixé est détaché (décroché du support de captage) au bout de 8 à 12 mois avant de passer à la phase de grossissement (Costil, 2010). Le naissain d'écloserie passe par la phase de micronurserie, puis de nurserie avant d'être vendu aux ostréiculteurs. L'huître adulte peut être cultivée selon trois types de méthodes : à plat (Marennes-Oléron) ; en eau profonde fixées sur des cordes amarrées à des systèmes flottants (Quiberon, étang de Thau) ; ou encore en zone intertidale, dans des poches en surélévation (Baie des Veys, Marennes-Oléron...) (Figure 1.9) (FAO, 2010).

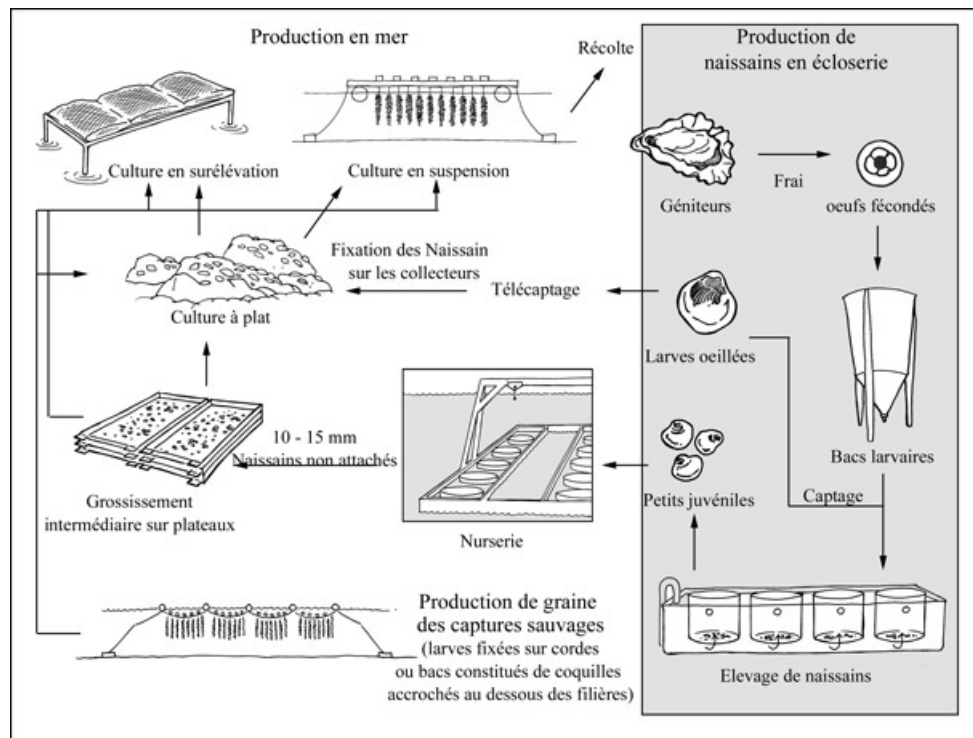


FIGURE 1.9 – Cycle et méthodes d'élevages de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. D'après FAO (2010).

### Mortalités ostréicoles

Si aujourd'hui c'est l'huître creuse *C. gigas* qui domine la production française, historiquement, d'autres espèces ont d'abord été cultivées. En effet, certaines preuves attestent de la culture de l'huître plate (*Ostrea edulis*) dès l'Antiquité. Cependant, dès les années 1750, des arrêtés ont été pris afin d'endiguer la surexploitation d'*O. edulis*. Suite à l'apparition de protozoaires parasites tels que *Martelia refringens* dans les années 1920 (Grizel *et al.*, 1974) et *Bonamia ostrea* dans les années 1970 et 1980 (Pichot *et al.*, 1980) responsables d'épizooties, les stocks d'*O. edulis* ont chuté de 15 000 à moins de 2000 tonnes. Afin de pallier à l'effondrement de ces stocks, l'huître *Crassostrea angulata* a été importée du Portugal à partir des années 1860. Après être devenue l'espèce dominante sur le littoral français, elle a été aussi victime de plusieurs épisodes de mortalités massives qui ont été associés à deux maladies différentes. La première vague de mortalités a eu lieu à partir de 1966 et a été attribuée à une maladie provoquée des Iridoviridae induisant des nécroses au niveau des palpes labiaux et des branchies (Comps, 1970). Une deuxième vague de mortalités observée à partir des années 1970 a mis en cause la "maladie hémocytaire" impliquant un autre iridovirus (Renault, 2006). Suite à l'effondrement des stocks d'*O. edulis* puis de *C. angulata*, des huîtres creuses *Crassostrea gigas* furent massivement importées depuis le Japon (stocks de naissain) et la Colombie Britannique (adultes). Ainsi en 2010, la production française était compo-

sée à plus de 98% par *C. gigas* (CNC, 2010). Cependant, depuis les années 1980, les exploitations ostréicoles françaises sont confrontées à des épisodes de mortalités massives des cheptels de *C. gigas* en période estivale. Ces mortalités sporadiques semblent avoir des causes multiples. En effet, le programme pluridisciplinaire MOREST (MORtalité ESTivale) achevé en 2005 a montré qu'elles étaient, comme pour l'ormeau, le résultat de l'interaction de trois compartiments : l'environnement, l'hôte et les agents pathogènes (Samain *et al.*, 2007). D'un point de vue environnemental, une température de l'eau élevée (supérieure à 19°C) ainsi que la proximité des huîtres par rapport au sédiment semblent être des facteurs importants de mortalité (Soletchnik *et al.*, 2007; Moullac *et al.*, 2007). De même, les mortalités apparaissent très fortement liées à l'état physiologique des huîtres en périodes printanière et estivale quand les animaux sont en phase de gamétogénèse active ou lorsqu'ils ont acquis la maturité sexuelle et sont prêts à pondre (Samain *et al.*, 2007). En effet, la gamétogénèse est particulièrement coûteuse en énergie (Royer *et al.*, 2008), cette dépense pouvant se faire au dépend de l'énergie allouée aux mécanismes de défense (Lambert *et al.*, 2007). D'autre part, les huîtres pleinement matures présentent un métabolisme très élevé à une période (été) pendant laquelle les ressources trophiques sont limitées (Enríquez-díaz, 2004). Les déficits énergétiques liés à la reproduction ne permettraient pas aux huîtres de résister si elles étaient soumises à un stress quelconque. Lorsque les huîtres sont physiologiquement fragiles, leur manipulation (retournement des poches) ou la présence d'agents infectieux (Herpes virus de type 1 ou bactéries *Vibrio splendidus* et *V. aesturianus*) par exemple, peuvent constituer un stress susceptible d'engendrer des mortalités. Enfin, dans le contexte des mortalités ostréicoles, la présence dans l'environnement de substances xénobiotiques pourrait être un facteur aggravant. Ceci est suggéré par le fait que les mortalités apparaissent souvent corrélées à la pluviosité sur les bassins versants des fleuves côtiers (Ropert *et al.*, 2008). Impactées par les xénobiotiques, les huîtres physiologiquement fragilisées seraient moins efficaces pour mettre en œuvre les processus de détoxification. Par ailleurs, à partir de 2008, des mortalités massives des stades les plus jeunes (naissain de 1<sup>ère</sup> année d'élevage et huîtres de 2<sup>ème</sup> année d'élevage) ont été observées dans les exploitations ostréicoles françaises et incriminent une variante du virus pathogène OsHV-1 (Ostreid Herpes Virus type 1) : l'OsHV-1  $\mu$ var (Garcia *et al.*, 2011).

## 1.4 Aspects réglementaires et synthèse sur la contamination des milieux aquatiques

### 1.4.1 Aspects réglementaires : Convention OsPar, DCE, DCSMM, REACH, réglementation sur les pesticides

Les environnements côtiers sont des zones à fort intérêt économique, notamment pour la conchyliculture et la pêche. La protection de la qualité de ces zones est devenue un enjeu majeur au niveau européen et différents outils réglementaires ont été mis en place. Par exemple, la convention OsPar (Oslo-Paris) entrée en vigueur en 1998 après son adoption par 15 pays et par l'Union Européenne (UE) a pour but, dans la zone de l'Atlantique Nord-Est, de :

- *"prévenir et supprimer la pollution provenant de sources telluriques"* ;
- *"prévenir et supprimer la pollution provenant des opérations d'immersion ou d'incinération"* ;
- *"prévenir et supprimer la pollution provenant de sources offshore"* ;
- *"évaluer la qualité du milieu marin."*

D'autres cadres réglementaires concernant directement ou indirectement les environnements côtiers et marins ont été mis en place au niveau européen. La Directive-Cadre sur l'Eau (2000/60/CE) (DCE) adoptée le 23 octobre 2000 établit un cadre réglementaire d'une politique sur l'eau au niveau européen. L'objectif pour 2015 est d'atteindre le "bon état" (chimique et écologique) des masses d'eau de surface et de rivière. Bien que la DCE concerne aussi les masses d'eau de transition (estuariennes et côtières), cette partie du territoire entre maintenant dans le champ d'action de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM). La DCSMM (2008/56/CE) vise à atteindre ou à maintenir un bon état écologique du milieu marin au plus tard en 2020. Ces objectifs sont :

- *"d'assurer la protection et la conservation et d'éviter la détérioration des écosystèmes marins"* ;
- *"de prévenir et d'éliminer progressivement la pollution"* ;
- *"de maintenir à un niveau qui soit compatible avec la réalisation du bon état écologique, la pression des activités humaines (pêche, utilisation de services divers...) sur le milieu marin"*. (Ifremer, 2013)

En plus des directives et conventions concernant les écosystèmes, l'UE a mis en place une réglementation concernant les produits chimiques depuis 2007. La réglementation REACH (2006/1907/CE) (enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances

CHimiques) adoptée en 2006 a pour objectif entre autres d'assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement contre les risques que peuvent poser les produits chimiques (hors biocides, pesticides, produits pharmaceutiques et cosmétiques qui possèdent leur propre législation). REACH oblige donc les industries à évaluer et à gérer les risques posés par les produits chimiques, notamment par la réalisation d'études écotoxicologiques utilisant des méthodes d'essais alternatives (tests *in vitro* et *in silico*). La législation européenne spécifique aux pesticides se compose des textes suivants :

- du règlement 1107/2009 qui concerne la mise sur le marché des produits phytosanitaires. La liste des substances actives autorisées se trouve dans le règlement d'exécution 540/2011 du 25 mai 2011 et celle des substances Carcinogènes Mutagènes Repro-toxiques (CMR) "préoccupantes", (cancérigènes 1A/1B, mutagènes 1A/1B, toxiques 1A/1B/2), se trouve dans le règlement 1272/2008 ;
- de la directive-cadre 2009/128/CE qui porte sur les plans nationaux d'utilisation durable des pesticides ;
- du règlement 1185/2009 qui organise le système statistique et les règlement/ directive 2009/127/CE qui contrôlent les machines destinées à l'application des pesticides ;
- du règlement 396/2005 qui définit les limites maximales de résidus des substances actives autorisées.

#### 1.4.2 Biosurveillance

En France, il existe des réseaux de surveillance de la qualité des eaux côtières qui possèdent des rôles différents et bien définis. Ainsi, la qualité chimique des eaux littorales est suivie par les différentes Agences de l'Eau et l'IFREMER. La qualité des eaux et sédiments portuaires en termes de germes fécaux et métaux lourds est évaluée par le réseau REPOM (Réseau de surveillance de la qualité des Eaux et sédiments des Ports Maritimes) alors que la qualité microbiologique des eaux de baignade est surveillée par la DGS (Direction Générale de la Santé). L'analyse des concentrations des produits chimiques dans le milieu apporte une première réponse quant à la qualité des écosystèmes. Cependant, de par leur mode de vie sessile et leur capacité à accumuler certains composés, des espèces de mollusques sont utilisées comme matrices bio-intégratrices dans le cadre de réseaux de surveillance. En effet, les analyses de phycotoxines, de germes bactériens ou de différents polluants (HAPs, PCBs, métaux, pesticides) dans les chairs de ces animaux donnent une image globale de la contamination sur la durée

de vie des organismes. Ces analyses permettent de détecter des épisodes de contamination passés que des analyses physico-chimiques ponctuelles ne seraient pas à même de détecter. En France, l'IFREMER gère les réseaux REMI (Réseau de contrôle Microbiologique des zones de production conchylicoles) et REPHY (Réseau de surveillance du phytoplancton et des PHYcotoxines) qui ont pour but, respectivement, d'analyser la présence d'*Echerichia coli* et d'effectuer un suivi du phytoplancton et des phycotoxines associées dans les organismes filtreurs des zones de production conchylicole (moules et huîtres). D'un point de vue plus local, le RHLN (Réseau Hydrologique Littoral Normand) s'intéresse à la qualité des masses d'eau littorales et évalue notamment leur niveau d'eutrophisation (Nedelec *et al.*, 2012).

Depuis 2008, le Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral (ROCCH) a pris la suite du RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin) qui avait été mis en place en 1974. Le ROCCH a un objectif de surveillance chimique des eaux littorales françaises et fournit des données dans les chairs de moules et d'huîtres sur la contamination en métaux (argent, cadmium, chrome, cuivre, mercure, nickel, plomb, vanadium, zinc), pesticides (DDT + métabolites et lindane), HAPs et PCBs. La synthèse la plus récente actuellement disponible sur les données RNO relatives aux concentrations des molécules pré-citées est retranscrite dans le tableau 1.3.

### 1.4.3 Contamination des milieux aquatiques estuariens et côtiers

Les milieux aquatiques et particulièrement les zones estuariennes sont des écosystèmes ayant des rôles extrêmement importants d'un point de vue économique et environnemental (Johnston, 1981). En effet, les écosystèmes estuariens et côtiers sont utilisés en tant que nourriceries et refuges pour les stades larvaires et juvéniles de nombreuses espèces de crustacés, de mollusques ou de poissons (Vasconcelos *et al.*, 2008; Kopp *et al.*, 2013). Cependant, ces écosystèmes complexes peuvent être la cible de contaminants d'origine anthropique. Comme cela a déjà été évoqué dans la partie rappelant le contexte de cette thèse, 20% de la pollution du milieu marin provient directement des activités réalisées en mer : dragages, substances rejetées par les bateaux et plateformes pétrolières (eaux usées, hydrocarbures, peintures anti-salissures...). 80% de cette pollution sont d'origine terrigènes et imputables à des activités effectuées bien en amont des milieux côtiers. Comme le souligne Gagnaire (2005), les polluants terrigènes peuvent être véhiculés par l'eau douce par le biais des rivières, du ruissellement et des nappes phréatiques et sont issus :

- des rejets directs d'eaux usées industrielles ou urbaines ;

- des rejets d'effluents traités provenant de STEP ;
- des écoulements des réseaux pluviaux.

Enfin, il est à noter que les polluants terrigènes peuvent également être d'origine atmosphérique (Marteil, 1974) et provenir de retombées sèches, de molécules dissoutes ou encore d'éléments particuliers transportés par les pluies.

*Le large éventail de molécules de contaminants et le nombre important de zones d'études à travers le monde rendent très difficile l'établissement d'une liste de la pollution globale à l'échelle mondiale. Dans ce paragraphe, le parti a été pris de s'intéresser uniquement à la contamination des zones estuariennes et côtières françaises ainsi qu'aux principales classes de contaminants. Les études et les données acquises dans le cadre des réseaux de surveillance font référence à différentes catégories de contaminants retrouvées dans le milieu marin et qui peuvent être des métaux, des HAPs, des molécules chlorées (polychlorobiphényles, polychlorodibenzo-p-dioxines, et polychlorodibenzo-furanes) ainsi que d'autres contaminants dits émergents. Les pesticides sont les molécules d'intérêt dans cette thèse et ont fait l'objet de relativement peu d'études dans les milieux estuariens et côtiers ; aussi la section les concernant est élargie au milieu dulçaquicole et à toutes les régions du monde.*

### Les métaux

Les métaux sont couramment retrouvés dans le milieu naturel. Ils sont (ou ont été) utilisés en grandes quantités dans de nombreux secteurs industriels, notamment dans la confection d'accumulateurs, d'équipements électriques et de pigments pour les peintures (Poëy et Philibert, 2000). Les données du ROCCH montrent que certaines molécules peuvent être retrouvées dans les chairs de mollusques de façon importante (Tableau 1.3 Figure 1.10). Dans les chairs de *C. gigas*, les médianes obtenus pour l'argent, le cuivre et le zinc s'élèvent, respectivement, à  $8,71 \text{ mg kg}^{-1}$  ;  $190 \text{ mg kg}^{-1}$  et  $2310 \text{ mg kg}^{-1}$  de poids sec (tableau 1.3). Chaque région présente une "spécificité" dans la contamination par les métaux qui est due principalement au passé industriel de la zone concernée. Par exemple, les forts écarts par rapport à la médiane nationale observés pour l'argent en Baie de Seine (Figure 1.10) sont dus aux effluents des industries photographiques qui l'utilisaient sous forme de nitrate d'argent, les traitements en station d'épuration n'étant pas toujours efficaces pour débarrasser les eaux de cet élément (ROCCH, 2013). De même, il est intéressant de noter que bien qu'il soit encore très présent dans les chairs d'huîtres en Gironde (Figure 1.10) avec des concentrations jusqu'à 60 fois les niveaux les plus faibles rencontrés en France (ROCCH, 2013), le cadmium est actuelle-



ment beaucoup moins retrouvé en Baie de Seine par rapport au passé (RNO, 2006). En plus des valeurs de concentrations en métaux fournies par le ROCCH, plusieurs études font état de la contamination des zones côtières par les métaux. Du Nord au Sud le long du littoral français, il est possible de citer Geffard *et al.* (2002) (Dunkerque, Arès, Bidassoa) ; Chevreuil *et al.* (1995, 1996) ; Grosbois *et al.* (2006) et (Meybeck *et al.*, 2007) (Baie de Seine) ; Monbet (2004, 2006) (Bretagne) ; Baudrimont *et al.* (2005) (Gironde) et Arleny *et al.* (2007) (Golfe de Gascogne).

TABLE 1.3 – Valeurs médianes, maximum et minimum de différents composés retrouvés dans les chairs de *Mytilus spp.* et *Crassostrea gigas* obtenues sur 5 ans (2000-2004). Les valeurs sont exprimées par rapport au poids sec des animaux. D'après RNO (2006).

	Manche-atlantique <i>C.gigas</i>	Manche-atlantique <i>Mytilus spp.</i>	Méditerranée <i>Mytilus spp.</i>
Ag (mg kg <sup>-1</sup> )	8,71 (0,76-99)	0,12 (0,03-7,75)	0,03 (0,01-0,036)
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	1,75 (0,43-56,3)	0,6 (0,17-3,03)	0,72 (0,2-10,0)
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	0,87 (0,15-14,1)	1,17 (0,32-9,21)	0,83 (0,12-3,77)
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	190 (6,72-2208)	6,7 (4,0-23)	6,8 (3,8-67)
Hg (mg kg <sup>-1</sup> )	0,2 (0,04-0,51)	0,12 (0,03-0,53)	0,12 (0,04-0,68)
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	1,02 (0,34-4,83)	1,55 (0,45-6,0)	1,48 (0,47-8,41)
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	1,4 (0,4-6,1)	1,4 (0,4-9,6)	1,8 (0,1-27,7)
V (mg kg <sup>-1</sup> )	1,17 (0,5-6,02)	1,62 (0,49-5,29)	1,4 (0,43-15,4)
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	2310 (425-7030)	85 (36-409)	152 (43-357)
DDT (µg kg <sup>-1</sup> )	7,09 (2,75-30,2)	5,3 (0,63-36,6)	15,1 (1,87-83,2)
Lindane (µg kg <sup>-1</sup> )	0,82 (0,29-7,12)	0,7 (0,13-4,96)	0,36 (0,1-1,75)
PCB 53 (µg kg <sup>-1</sup> )	20,7 (4,19-189)	19,4 (0,16-495)	18,7 (1,57-593)
Fluoranthène (µg kg <sup>-1</sup> )	34,7 (8,0-95,1)	21,4 (4,0-245)	13,2 (2,19-243)

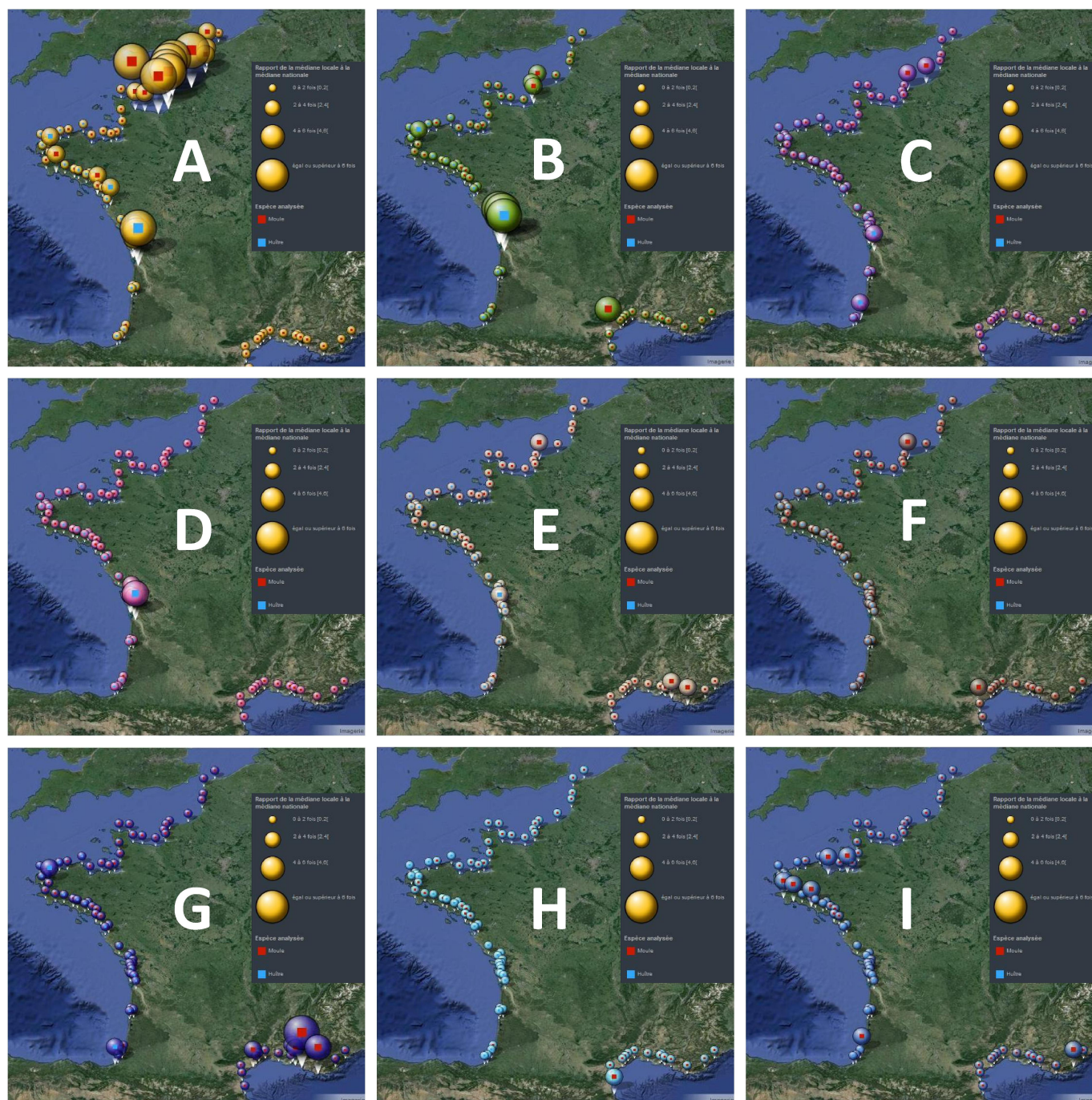


FIGURE 1.10 – Cartes du littoral français représentant la contamination par les métaux dans les chairs des moules (rouge) et des huîtres (bleu). A : argent ; B : cadmium ; C : chrome ; D : cuivre ; E : mercure ; F : nickel ; G : plomb ; H : vanadium ; I : zinc. Pour chaque couple contaminant-coquillage, la médiane nationale est calculée sur l'ensemble des observations. La médiane est ensuite calculée pour chaque point et rapportée à la médiane nationale. Les résultats sont répartis en 4 classes : 0 à 2 fois, 2 à 4 fois, 4 à 6 fois, égal ou supérieur à 6 fois la médiane nationale. Sur la carte, chaque classe est associée à une taille de symbole. D'après ROCCH (2013).

### Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

Les HAPs sont des hydrocarbures formés de cycles benzéniques condensés sous forme linéaire ou angulaire et dont on dénombre des milliers de congénères. Les HAPs présents dans l'environnement résultent d'apports liés à différents phénomènes. Ils peuvent être générés de manière naturelle par les feux de forêts, les éruptions volcaniques ou les fuites de réserves naturelles de pétrole. Cependant, ils proviennent surtout d'activités humaines telles que la combustion des carburants fossiles ou encore l'exploitation du pétrole (fuites lors de l'exploitation ou du transport et opérations de dégazage). Le nombre de sources de HAPs étant très important, la répartition de ces composés sur le littoral français est très hétérogène. Certains sites du littoral français que l'on croyait exempts de ce type de pollution se trouvent néanmoins sous l'influence d'activités (plaisance, pêche) entraînant une contamination importante par ces composés ou d'une rivière drainant un bassin urbanisé (ROCCH, 2013). Selon les données du RNO et du ROCCH, la Baie de Seine est particulièrement touchée par cette pollution puisque les concentrations en fluoranthène retrouvées dans les chairs d'huîtres dépassent de plus de 6 fois les valeurs de la médiane nationale ( $34,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Tableau 1.3) (ROCCH, 2013; RNO, 2006). Parmi les études concernant les concentrations en HAPs dans le milieu marin, certaines font état de la contamination de la Méditerranée (Baumard *et al.*, 1998b); du Bassin d'Arcachon (Baumard *et al.*, 1998a); de la côte aquitaine (Soclo *et al.*, 2000) et de la Baie de Seine (Fernandes *et al.*, 1997; Carpentier *et al.*, 2002; Cachot *et al.*, 2006; Motelay-Massei *et al.*, 2007).

### Polychlorobiphényles, polychlorodibenzo-p-dioxines, et polychlorodibenzo-furanes

Ces trois familles de composés sont formées de molécules plus ou moins chlorées qui figurent parmi les plus toxiques de la planète. Les PCBs forment une famille de 209 composés aromatiques organochlorés dérivés du biphenyle tandis que les PolyChloroDibenzo-p-Dioxines (PCDDs) et les PolyChloroDibenzo-Furanes (PCDFs) sont représentés par 75 et 135 congénères, respectivement. Étant extrêmement stables, ces composés sont très persistants dans l'environnement et leurs temps de demi-vie dans l'eau peuvent varier de 1450 ans (PCB 28) à plus de 192 000 ans (octachlorodibenzofurane). De plus, ces trois familles de composés sont de part leur nature très hydrophobes et bioaccumulables. La plupart du temps, la contamination des milieux par ces composés est donc appréhendée en analysant les concentrations retrouvées dans les tissus des animaux. Les données du réseau ROCCH relative à la contamination

d’huîtres et de moules par le PCB 53 (représentatif de la répartition de l’ensemble des congénères) montrent des concentrations importantes, notamment dans l’estuaire de la Seine où la médiane des concentrations est supérieure à 17 fois la médiane nationale (ROCCH, 2013; RNO, 2006) (Tableau 1.3). De plus, la répartition des PCBs au niveau du littoral français présente le même profil relatif que celui observé il y a 30 ans, ce qui montre la très forte rémanence de ces molécules (ROCCH, 2013). Munschy *et al.* (2010) ont réalisé une étude sur les concentrations de PCDDs et PCDFs retrouvées dans les tissus de moules et d’huîtres réparties sur l’ensemble des côtes françaises. Les résultats montrent une grande similarité avec ce qui est observé pour les PCBs. En effet, les mollusques de la Baie de Seine présentent les plus fortes concentrations au niveau national avec  $86 \text{ pg g}^{-1}$  de poids sec pour la somme des congénères (*versus* médiane de  $49.5 \text{ pg g}^{-1}$  dans la Manche).

### Contaminants émergents

En plus des principales classes de polluants classiquement retrouvées et étudiées dans les environnements côtiers (métaux, HAPs, PCBs, PCDDs, PCDFs), d’autres contaminants dits émergents sont aujourd’hui de plus en plus pris en compte. C’est le cas, par exemple, des retardateurs de flamme bromés, comme les PolyBromoDiphénylEthers (PBDEs) et l’HexaBromoCyclodoDécane (HBCD). Bien que retirés progressivement du marché pour l’horizon 2014, ces différents composés sont retrouvés dans l’environnement (Munschy *et al.*, 2010). Comme c’est le cas pour d’autres xénobiotiques, les concentrations en PBDEs les plus importantes sont retrouvées en Baie de Seine ( $3688 \text{ pg g}^{-1}$  de poids sec *vs* médiane de la Manche :  $1114 \text{ pg g}^{-1}$ ). Quant aux HBCD, les teneurs les plus importantes sont détectées dans des moules (*Mytilus ssp*) provenant du Golfe de Saint-Jean-de Luz ( $2677 \text{ pg g}^{-1}$  de poids sec *vs* médiane de l’Atlantique :  $182 \text{ pg g}^{-1}$ ) (Munschy *et al.*, 2010).

Les résidus pharmaceutiques ainsi que les produits de soin (cosmétiques, filtres anti-UV) font l’objet de préoccupations grandissantes. Comparé à la Gironde la Loire et L’Adour, l’estuaire de la Seine est fortement contaminé par les 7 composés pharmaceutiques recherchés :  $610$  et  $380 \text{ ng L}^{-1}$  pour l’ibuprofène et le diclofénac respectivement (Budzinski et Forget-Leray, 2008). Munaron *et al.* (2012) ont montré, pour la première fois, la présence de composés pharmaceutiques dans les eaux côtières méditerranéennes françaises grâce à l’utilisation d’échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler). Bachelot (2010) et Bachelot *et al.* (2012) ont mesuré les concentrations de molécules utilisées dans les filtres anti-UV (crèmes solaires)

dans la chair de moules *Mytilus spp.* sur les façades atlantiques et méditerranéennes. Les résultats ont montré la présence de ces molécules dans les moules provenant de sites côtiers touristiques, surtout en période estivale.

#### 1.4.4 Cas des pesticides

##### Définition

Le terme de pesticide sert à désigner toute substance ou préparation utilisée pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables. Ce terme regroupe deux types de produits : les biocides et les Produits PhytoPharmaceutiques (PPPs) (ou phytosanitaires). Les produits phytopharmaceutiques sont définis par la directive 91/414/CEE du 15 juillet 1991 comme *"les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à :*

- *protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, pour autant que ces substances ou préparations ne soient pas autrement définies ci après.*
- *exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance) ;*
- *assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conserveurs ;*
- *détruire les végétaux indésirables ;*
- *détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux."*

Les biocides sont définis par la directive du parlement européen et du conseil n°98/8/CE du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides (JOCE n°L 123 du 24 avril 1998) comme : *"Les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur, qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique"*. Les biocides comprennent notamment les produits antiparasitaires tels que les insecticides (contre les insectes et autres arthropodes), les molluscicides (contre les limaces et escargots) ou encore les rodenticides (contre les rongeurs).

*Le terme de pesticide sera employé dans la suite de ce mémoire pour décrire les produits phyto-*



*pharmaceutiques et les biocides.*

### Consommation en pesticides

À ce jour, l'Europe est le plus gros consommateur de pesticides dans le monde et la France fait partie des cinq plus gros consommateurs, producteurs et revendeurs de pesticides avec la Chine, les États-unis, le Brésil et le Japon (Zhang *et al.*, 2011). En Europe, sur la période 2007-2008, la France est restée le plus gros consommateur de pesticides, suivie par l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne et le Royaume-Uni. Sur cette même période, le type de pesticides le plus consommé dans le monde parmi les différentes catégories (insecticides, fongicides/bactéricides, herbicides) est celui des herbicides (Zhang *et al.*, 2011) et parmi ceux-ci, les herbicides à base de glyphosate sont les plus utilisés (Baylis, 2000; Woodburn, 2000). En France, une baisse de la consommation de pesticides est observée depuis une dizaine d'années (UIPP, 2012). Ainsi si la consommation était de plus de 120 000 tonnes en 1999, elle est, selon les dernières données disponibles (année 2011), de 62 700 tonnes (UIPP, 2012) (Figure 1.11). En 2010, les pesticides les plus vendus en France étaient les herbicides avec un marché de plus de 768 millions d'euros suivis des fongicides (674 millions d'euros) alors que les produits divers et les insecticides représentaient respectivement des marchés de 216 et 141 millions d'euros.

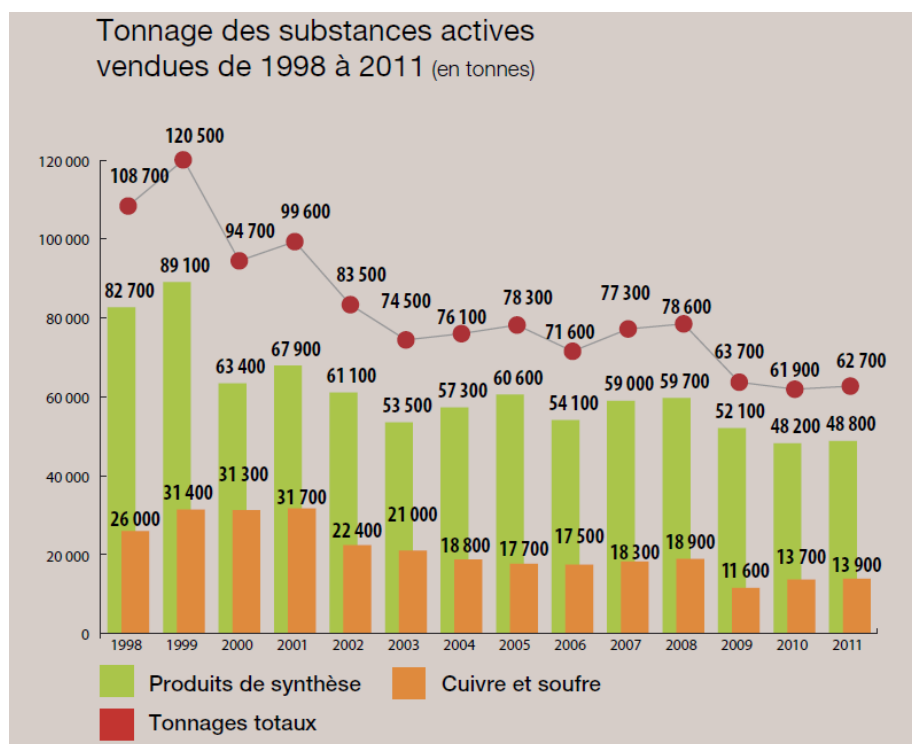


FIGURE 1.11 – Évolution des ventes de pesticides en France (tonnes) sur la période 1998-2011. D'après UIPP (2012).

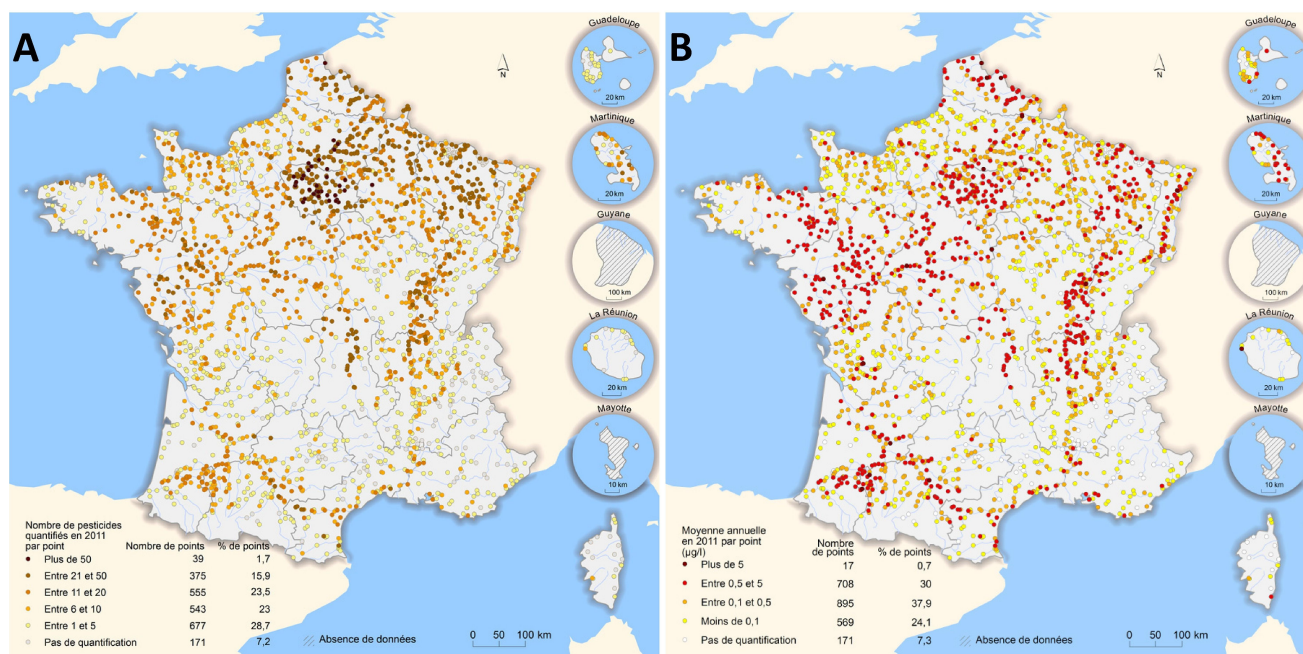


FIGURE 1.12 – A : nombre de pesticides quantifiés en 2011 dans les eaux de surface ; B : concentrations totales moyennes des pesticides dans les eaux de surface en 2011. *D'après* Commissariat Général au Développement Durable (2013).

### Pesticides dans les milieux dulçaquicoles

La contamination des eaux de surface par les pesticides est effective ; en 2011, sur les 550 molécules recherchées par les Agences de l'Eau, 377 ont été décelées au moins une fois et 93% des points contrôlés (2195 sur 2360 points) présentaient des traces de contamination par ces substances (Commissariat Général au Développement Durable, 2013) (Figure 1.12). La même année (2011), 70% (3099 occurrences) des stations contrôlées montraient des concentrations totales inférieures à  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , seulement 0,7% de celles-ci (17 stations) présentaient des teneurs en pesticides supérieures à  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  et 67,9 % des stations montraient des concentrations comprises entre  $0,1$  et  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Les zones dans lesquelles sont retrouvées ces fortes concentrations correspondent à des régions céréalières, de maïsiculture ou de viticulture (Nord de la France, Bassin Parisien, Sud-Ouest). Toujours en 2011, les quinze substances les plus quantifiées appartenaient essentiellement à la catégorie des herbicides ou à celle des composés de dégradation (appelés également métabolites) issus d'herbicides (Commissariat Général au Développement Durable, 2013). Ainsi, la molécule la plus retrouvée dans les cours d'eau de France métropolitaine est l'AMPA (Amino Méthyl Phosphonic Acid) qui est le produit de dégradation du glyphosate (Figure 1.13). L'AMPA est décelé dans plus de 60% des analyses alors que sa molécule mère, qui occupe la deuxième place du classement, est retrouvée dans plus d'un tiers des analyses. Ces deux molécules sont de plus en

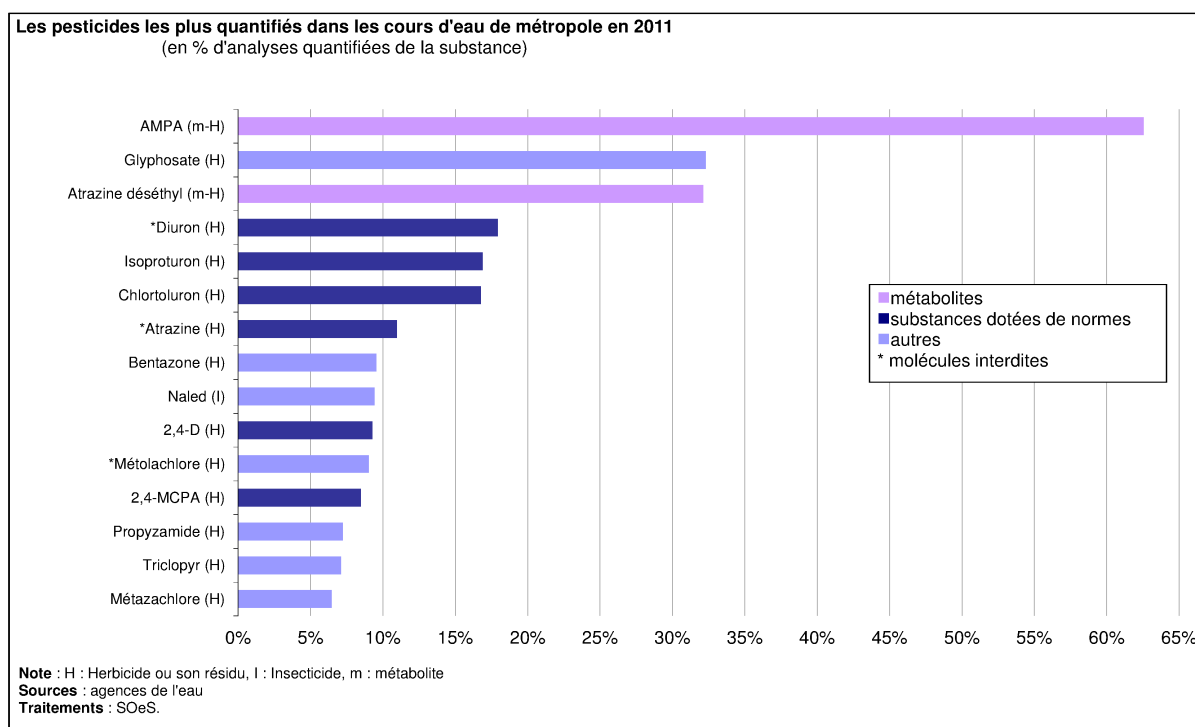


FIGURE 1.13 – Classement des molécules les plus quantifiées dans les rivières de France métropolitaine en 2011. D'après Commissariat Général au Développement Durable (2013).

plus retrouvées dans l'environnement et une augmentation notable de leur détection et de leur concentration est observée. En effet, les concentrations de glyphosate ont augmenté de plus de 10% entre 2010 et 2011 sur 48% des stations analysées et celles d'AMPA ont crû de 10% sur 66% des points d'analyse pendant la même période. En dépit de leur interdiction, certains composés comme le diuron (interdit depuis 2008), l'atrazine ou le métolachlore (interdits depuis 2003) sont encore très présents dans les hydrosystèmes et se classent encore parmi les 15 molécules les plus détectées (Figure 1.13). Beaucoup de pesticides présents dans ce classement sont utilisés pour des usages agricoles proches : douze molécules parmi les quinze sont des herbicides, certains tels que le chlortoluron et l'isoproturon sont principalement associés aux grandes cultures (blé tendre, orge d'hiver) tandis que le métazachlore est utilisé sur le colza. Enfin, le glyphosate, le propyzamide, la bentazone ou le 2,4D ont des usages plus généralisés (Commissariat Général au Développement Durable, 2013).

Parallèlement au classement des quinze molécules les plus fréquemment détectées dans les eaux de surface, des études confirment la présence récurrente du glyphosate et de son métabolite dans les rivières françaises. Ainsi, Botta et ses collaborateurs (2009) ont détecté de fortes concentrations en glyphosate et en AMPA après des épisodes de pluie (concentrations en molécule mère comprises entre 75 et 90  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dans un collecteur d'eau pluviale. Ces mêmes auteurs ont estimé que la charge en glyphosate en-



trant directement dans le réseau hydrographique du bassin versant d'un affluent de la Seine (rivière Orge) atteignait  $1,9 \text{ kg année}^{-1}$  dans les zones agricoles et dépassait  $179 \text{ kg année}^{-1}$  dans les zones urbaines, montrant ainsi l'importance des apports en pesticides par les particuliers. En examinant la littérature, il est intéressant de noter que le classement à l'échelle de la France présente des similitudes avec ce qui peut-être observé en Europe et dans le monde. Howe et ses collaborateurs (2004) confirment que le glyphosate et ses formulations commerciales de type Roundup® sont parmi les plus utilisés dans le monde. Kolpin *et al.* (2006) font état de la présence d'AMPA et de glyphosate dans des rivières et des effluents traités de stations d'épuration. Dans cette étude, l'AMPA (maximum de  $3,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) était détecté dans 67,5% des échantillons analysés (40 au total) tandis que le glyphosate ( $2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) était présent dans 17,5 % des cas. Dans une étude menée par Puértolas et ses collaborateurs (2010), les concentrations en glyphosate retrouvées dans la rivière Llogrebat (Espagne) étaient comprises entre 20 et  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  après une pulvérisation terrestre. De même, ces auteurs rapportent des pics de concentrations pouvant atteindre  $137 \mu\text{g L}^{-1}$ , trois jours après l'application de l'herbicide.

Certaines molécules qui ne sont pas citées dans le classement des quinze substances les plus quantifiées sont cependant retrouvées à des concentrations non négligeables dans certains cours d'eau. Ainsi, en Normandie, les herbicide de la famille des acides aryloxy-alcanoïques tels que le mécoprop (MCP) ou le MCPA font partie du "top 10" des herbicides les plus utilisés. Les plus fortes valeurs retrouvées en 2006 dans les rivières étaient de  $0,084 \mu\text{g L}^{-1}$  (mécoprop) et  $0,091 \mu\text{g L}^{-1}$  (MCPA) (Agence de l'Eau Seine Normandie, *communication personnelle*). Comme le montre la littérature, ces molécules sont souvent détectées dans les hydrosystèmes suisses (Gerecke *et al.*, 2002 :  $> 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  ; Wittmer *et al.*, 2010 :  $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$  avec des pics atteignant  $32 \mu\text{g L}^{-1}$ ). D'autres auteurs indiquent que les concentrations en mécoprop retrouvées dans les milieux aquatiques dépendent fortement de la période à laquelle sont faites les analyses et qui peut correspondre ou non à la période d'application de cet herbicide (Loos *et al.*, 2010). Ainsi, les concentrations maximum de mécoprop détectées dans des hydrosystèmes de la région de Barcelone se sont révélées plus importantes en avril ( $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$ ) qu'en octobre ( $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

#### **Pesticides dans les milieux estuariens et côtiers**

Les études faisant état de la contamination des zones côtières et estuariennes par les pesticides concernent principalement les molécules dites persistantes telles que

les insecticides organochlorés DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane) et le lindane ( $\gamma$ -HCH). Bien que faisant l'objet d'une interdiction de vente et d'utilisation depuis de nombreuses années en France (DDT : 1972 ; lindane : 1998), les concentrations retrouvées dans les chairs de moules et d'huîtres demeurent relativement fortes. Ainsi, d'après les données du ROCCH, la médiane nationale pour le DDT est encore de  $7,02 \mu\text{g kg}^{-1}$  avec un maximum de  $30,02 \mu\text{g kg}^{-1}$  dans la chair des huîtres de la façade Manche-Atlantique (Tableau 1.3) (Figure 1.14). Au niveau de la Manche, seule la Seine semble drainer encore des quantités significatives de DDT alors que les fortes concentrations retrouvées auparavant au niveau de la Gironde, d'Arcachon et du Pays Basque sont en forte baisse depuis les années 1980 (RNO, 2006). En dépit de fortes baisses en cours du temps, le bassin méditerranéen est aujourd'hui la zone présentant la plus forte contamination (Figure 1.14). Les concentrations en lindane ont aussi fortement chuté depuis l'interdiction de ce composé. Des zones auparavant très contaminées comme la Charente sont aujourd'hui à peine au dessus de la médiane nationale ( $0,82 \mu\text{g kg}^{-1}$  ; Tableau 1.3) alors que les côtes bretonnes enregistrent une baisse moins importante avec des concentrations 4 à 6 fois supérieures à la médiane nationale (Figure 1.14). Les études réalisées dans différents écosystèmes de la planète ont mis en évidence la forte persistance de ces deux molécules dans l'environnement. Ainsi, Pandit et ses collaborateurs ont montré (2006) que le DDT et ses congénères (DDE et DDD) étaient retrouvés à des concentrations de  $3,01$  à  $33,21 \text{ ng L}^{-1}$  dans l'eau de mer de la région de Mumbai (Inde) alors que le lindane et ses congénères ( $\gamma$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\delta$ -HCH) présentaient des concentrations comprises entre  $0,16 \text{ ng L}^{-1}$  et  $15,92 \text{ ng L}^{-1}$ . De même, l'étude de Monirith et ses collaborateurs (2003) réalisées dans le cadre du programme "Mussel-Watch" (équivalent du RNO-ROCCH français) a montré la très forte contamination par 1) le DDT et ses congénères dans des moules provenant d'environnements côtiers de Chine, de Hong Kong et du Vietnam et 2) le lindane (et ses congénères) dans des moules d'Inde et de Chine.

Le nombre d'études relatant la contamination des milieux côtiers par les pesticides autres que les organochlorés en France reste assez limité. Dans leur rapport publié en 2007, Auby et ses collaborateurs se sont intéressés à la contamination du Bassin d'Arcachon par des insecticides (fipronil et ses métabolites, chlorpyrifos-éthyl et son métabolite le TCP, chlorfenapyr, bifenthrine, cyperméthrine, perméthrine et lindane) ; des herbicides (diuron, terbutylazine et son métabolite le DET, métolachlore, alachlore, oxadiazon) et un algicide (irgarol). Ces auteurs ont montré que toutes les molécules

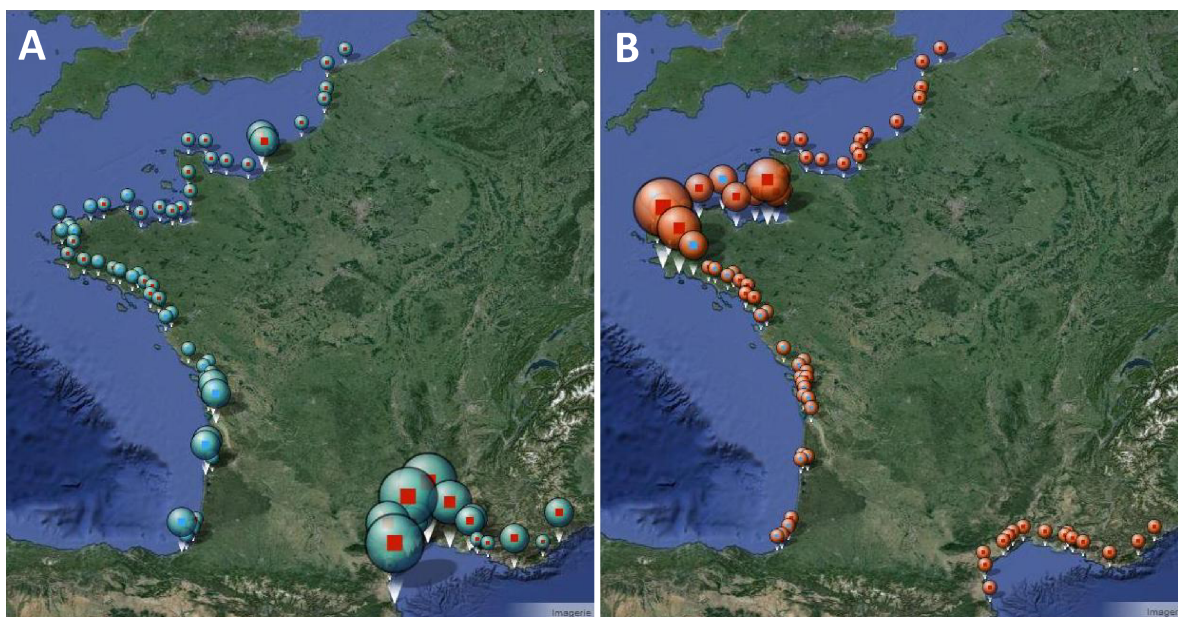


FIGURE 1.14 – Cartes du littoral français représentant la contamination par les pesticides dans les chairs des moules (rouge) et des huîtres (bleu). A : DDT ; B : lindane. Pour chaque couple contaminant-coquillage, la médiane nationale est calculée sur l'ensemble des observations. La médiane est ensuite calculée pour chaque point et rapportée à la médiane nationale. Le résultat est réparti en 4 classes : 0 à 2 fois, 2 à 4 fois, 4 à 6 fois, égal ou supérieur à 6 fois la médiane nationale. Sur la carte, chaque classe est associée à une taille de symbole. D'après (ROCCH, 2013)

d'insecticides ont été détectées au moins une fois dans les différents compartiments étudiés (eau de mer, sédiment, chair des huîtres) avec des concentrations maximale de  $0,270 \mu\text{g L}^{-1}$  pour le bifentrine dans l'eau de mer, de  $13 \mu\text{g kg}^{-1}$  de poids sec pour le chlorpyrifos dans les sédiments et de  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$  de poids sec pour la perméthrine dans la chair des huîtres. Les composés anti-salissures et herbicides ont aussi tous été détectés dans l'eau de mer et dans la chair des huîtres (mais non dans le sédiment) à des concentrations maximales de  $0,066 \mu\text{g L}^{-1}$  (irgarol dans l'eau de mer) et de  $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de poids sec (diuron dans les chairs d'huîtres). Les résultats de Burgeot *et al.* (2008) montrent des cumuls de concentrations en pesticides pouvant dépasser  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  dans l'estuaire inférieur de la Seudre en 2003 avec notamment des pics de concentration de  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  d'isoproturon ; de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  de glyphosate et de  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  de mecoprop.

Dans une étude publiée en 2006, Munaron et ses collaborateurs ont analysé et modélisé l'apport de pesticides par la Charente au milieu côtier. 22 matières actives (dont l'atrazine, la simazine, le diuron et l'isoproturon) et 7 métabolites [DesEthyl- Atrazine (DEA), DesIsopropyl-Atrazine (DIA), DesEthyl-Ter-buthylazine (DET), DichloroPhenyl-Methyl-Urea (DPMU), DichloroPhenyl-Urea (DPU), Isopropyl-Phenyl-Methyl-Urea (IPMU), Isopropyl-Phenyl-Urea (IPU)] ont été recherchés. Les auteurs mettent en évidence des pics de concentrations, particulièrement lors de la période d'application. De plus, les concentrations ne descendent généralement pas en

dessous  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  et les auteurs indiquent des périodes d'apports très importants pendant lesquelles plus de 400 kg de matières actives peuvent arriver dans l'estuaire via la rivière Charente. En Normandie (Baie des Veys), 6 herbicides sur les 15 molécules recherchées ont été détectés dans l'eau de mer à marée basse (Buisson *et al.*, 2008). Ces auteurs ont mesuré dans l'eau de mer des concentrations en diuron comprises entre  $0,015$  et  $0,132 \mu\text{g L}^{-1}$  alors que la teneur la plus élevée dans la rivière Vire s'élevait à  $0,254 \mu\text{g L}^{-1}$ . Enfin, le site étudié le plus sous influence estuarienne était plus contaminé que le site le plus maritime (Buisson *et al.*, 2008). Cependant, ces auteurs n'ont pas mis en évidence d'accumulation des pesticides mesurés dans l'eau dans la chair des huîtres. L'utilisation de nouveaux outils tels que les échantillonneurs passifs de type POCIS permet de prendre en compte la pollution de manière intégrée sur toute la période de temps où ils sont déployés. Ainsi grâce à ces capteurs, Munaron *et al.* (2012) ont montré la présence de 15 molécules d'herbicides et métabolites (acetochlor, alachlor, atrazine, chlorotoluron, DEA, DIA, dimethachlor, diuron, 3,4-DichloroPhenylMethylurée, isoproturon, propazine, simazine, S-Metolachlor, terbuthylazine, terbutryn) et d'une molécule algicide (irgarol) au niveau des eaux côtières et lagunaires (étang de Berre, étang Thau, étang de Diane) de la méditerranée française.

## 1.5 Effets des pesticides sur les mollusques marins

Les analyses de polluants réalisées dans les différents compartiments de l'environnement (colonne d'eau, sédiment, chair des animaux) permettent d'évaluer la contamination présente et/ou passée des écosystèmes. Cependant, elles ne permettent pas de faire le lien entre les teneurs en substances recherchées et les possibles dommages induits chez les animaux exposés à ces substances. Les écotoxicologues ont donc introduit la notion de biomarqueurs qui peut être définie comme tout changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). Si les études écotoxicologiques passent *de facto* par l'utilisation de biomarqueurs, il faut cependant prendre garde à l'interprétation qui est faite de la variation de ces biomarqueurs. Ainsi pour la plupart, les biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un composé chimique et pourront, dans le meilleur des cas, l'être d'une famille de molécules. Dans le cas d'études de terrain, il est important de connaître les variations saisonnières des biomarqueurs étudiés qui peuvent être importantes et aboutir à des interprétations er-

ronées ; c'est le cas de la variation saisonnière de l'expression de certains gènes (Farcy *et al.*, 2007). L'étude des biomarqueurs peut se faire à différents niveaux d'organisation du vivant (Figure 1.15). Ainsi, si les biomarqueurs relatifs aux paramètres moléculaires sont d'un fort intérêt mécanistique, l'interprétation des résultats les concernant ne pourra pas servir à appréhender l'impact au niveau écologique et *vice versa*.

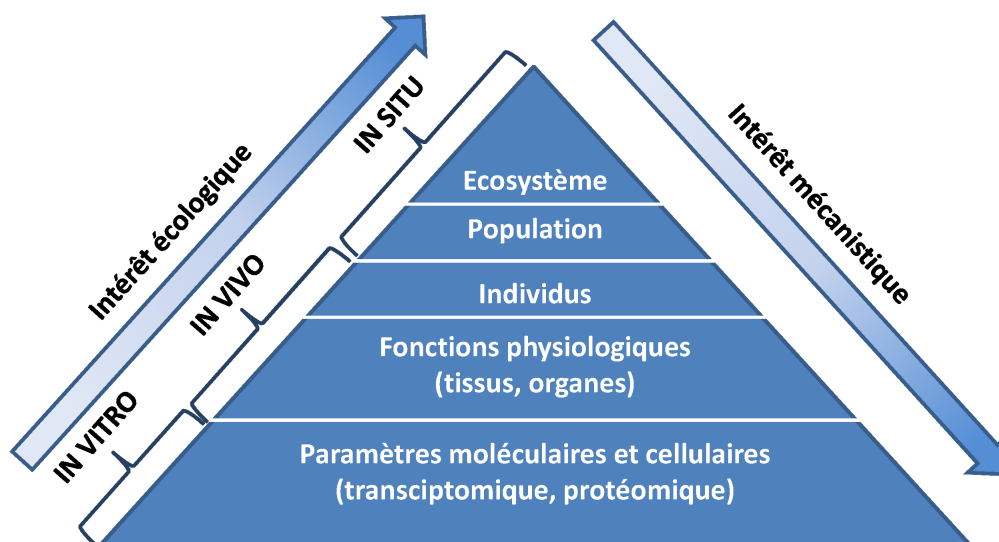


FIGURE 1.15 – Représentation des niveaux d'étude des biomarqueurs et de leur intérêt au niveau écologique ou mécanistique. D'après (Snape *et al.*, 2004)

*Les études faisant référence à des biomarqueurs utilisés pendant la thèse seront présentées dans la partie 1.6.*

### 1.5.1 Insecticides

L'examen de la littérature montre que parmi toutes les études concernant les pesticides et les mollusques marins, celles s'intéressant aux insecticides restent les plus nombreuses. Parmi les insecticides, la classe des carbamates est connue pour son action inhibitrice de l'AcétylCholineEstérase (AChE). Bocquené et ses collaborateurs (1997) ont montré l'existence chez *C. gigas* de deux cholinestérases, l'une membranaire et sensible à l'action de différents carbamates (eserine, carbaryl et carbofuran) (type "A") tandis que le type "B" est soluble et insensible à l'action de ces mêmes molécules (tests *in vitro*). L'inhibition de l'AChE ainsi que des carboxylesterases a aussi été mis en évidence *in vitro* chez la moule *Mytilus edulis* en présence d'eserine (Galloway *et al.*, 2002). L'inhibition de l'AChE et des carboxylesterases a aussi été étudiée chez les mollusques marins après une contamination par une autre classe d'insecticides que constituent les organophosphorés. Les auteurs de plusieurs études ont rapporté l'inhibition de ces

enzymes par différents pesticides : le paraoxon (Gagnaire *et al.*, 2006; Bocquené *et al.*, 1997; Galloway *et al.*, 2002; Ozretić et Krajnović-Ozretić, 1992) (*C. gigas*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*); le DFP (DiisopropylFluoroPhosphate) (Bocquené *et al.*, 1997; Galloway *et al.*, 2002) (*C. gigas*, *M. edulis*); l'iso-OMPA (tetraisopropyl pyrophosphoramidate) (Bocquené *et al.*, 1997) (*C. gigas*); le chlorpyrifos (Galloway *et al.*, 2002) (*M. edulis*), ou encore l'azamethiphos (Canty *et al.*, 2007) (*M. edulis*). En plus de l'inhibition de certaines enzymes, les organophosphorés sont susceptibles d'impacter d'autres paramètres biologiques. Ainsi, Canty et ses collaborateurs (2007) ont montré un effet de l'azamethiphos sur la phagocytose des hémocytes de *M. edulis* tandis que la viabilité cellulaire et le taux de filtration n'étaient pas affectés. Gagnaire et ses collaborateurs (2006) ont rapporté l'effet du paraoxon sur la baisse du nombre d'hémocytes présentant des lysosomes ainsi qu'une augmentation de la production des Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DRO) chez *C. gigas*. L'effet génotoxique d'un insecticide organophosphoré, le MonoCrotoPhos (MCP) a été étudié par Revenkar et ses collaborateurs (2009) chez *Meretrix ovum*, un bivalve estuarien. Ces auteurs ont montré une augmentation du nombre de micro-noyaux ainsi que des changements importants dans les ratios ARN/ADN après une exposition au MCP et ce dès la plus faible dose testée (5,5 mg L<sup>-1</sup>). De par leur utilisation massive dans les années 1950-1960 et malgré l'interdiction de plusieurs molécules, les insecticides organochlorés et notamment le DDT et le lindane sont encore étudiés de manière relativement importante. Ainsi, les concentrations en DDT induisant 50% de mortalité (CL<sub>50</sub>) chez des juvéniles de *Merceneria merceneria* exposés à une solution aqueuse pendant 24h ou après 10 jours d'exposition à un sédiment contaminé sont égales à 610 µg L<sup>-1</sup> et 5800 µg kg<sup>-1</sup> respectivement (Chung *et al.*, 2007). De même, les effets du lindane sur les hémocytes de *C. gigas* ont été évalués par Anguiano et ses collaborateurs (2007) et des effets cytotoxiques (CL<sub>50</sub> : 2,22 mg L<sup>-1</sup>), génotoxiques (test des comètes : Concentration Minimale avec Effet Observé (CMEO) = 0,7 mg L<sup>-1</sup>) et physiologiques (taux de filtration : CMEO = 0,3 mg L<sup>-1</sup>) ont été enregistrés. L'effet génotoxique des organophosphorés comme l'endosulfan a été montré chez *C. gigas* chez qui l'augmentation significative des dommages à l'ADN a été observée à la concentration de 150 nM (Wessel *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Fongicides

Parmi les études concernant les effets des fongicides, figurent celles de Baier-Anderson et Anderson (2000) et Gagnaire *et al.* (2006) qui se sont intéressés à l'effet du chlorothalonil (TCIN) *in vitro* chez l'huître. Une baisse dose-dépendante de la production des

DROs a été montrée par Baier-Anderson et Anderson (2000) alors que la phagocytose et le niveau de base de l'activité NAD[P]H n'étaient pas affectés. Les résultats de Gagnaire *et al.* (2006) montrent un effet du fongicide sur la mortalité (CMEO = 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), l'augmentation du nombre de granulocytes (CMEO = 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) et la baisse de l'activité des estérases (CMEO = 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Chez *Crassostrea virginica*, un effet *in vitro* d'une formulation commerciale à base de triphorine a été mis en évidence sur la viabilité, la phagocytose et la fixation des hémocytes dans la gamme de concentration allant de 0,0295 à 1,966  $\mu\text{g}$  de triforine par mL d'hémolymphe (Alvarez et Friedl, 1992).

### 1.5.3 Herbicides et algicides

Le but premier des herbicides est de détruire les végétaux ou parties de végétaux ainsi que de freiner ou prévenir une croissance indésirable des plantes. Bien que les animaux ne soient pas leur cible originelle, diverses études montrent l'impact de cette catégorie de pesticides sur les mollusques marins. Par exemple, le 2,4-D (acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique) impacte significativement la viabilité d'hémocytes de *C. gigas* exposés à une concentration de 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Gagnaire *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été montré que l'atrazine et le diuron ont un effet sur l'aneuploïdie de *C. gigas* (Bouilly *et al.*, 2003, 2007) et cet effet peut persister chez la descendance des individus exposés (Bouilly *et al.*, 2004, 2007). De plus, ces auteurs (2007) ont rapporté un effet du diuron sur les paramètres hémocytaires d'huîtres exposées pendant une période de 11 semaines. La survie cellulaire, le taux de phagocytose, le pourcentage de granulocytes, la quantité de DROs et la présence de lysosomes ont été impactés après 4 semaines d'exposition à ce composé (Bouilly *et al.*, 2007). Chez *C. gigas*, Akcha et ses collaborateurs (2012) ont montré via le test des comètes que le diuron pouvait induire des cassures de l'ADN chez des spermatozoïdes dès la concentration de 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$  alors que le glyphosate n'était pas génotoxique dans la gamme de concentrations et dans les conditions testées. Luna-Acosta *et al.* (2012) ont mis en évidence l'inhibition de certaines enzymes telles que la phénoloxydase ainsi que des modifications du taux d'expression de certains gènes (entre autre Mpeg1 : Macrophage expressed protein 1 like) suite à l'exposition à la dose de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diuron. L'effet génotoxique de l'irgarol (algicide organochloré) a été rapporté par Mai *et al.* (2012) chez des larves d'huîtres dès la concentration de 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Une étude conduite chez des adultes de *C. gigas* exposés au glyphosate (Tanguy *et al.*, 2005a) a montré l'existence, dès 14 jours d'exposition, de variations de certains gènes (notamment Lipoprotein receptor et HypertenSion-related Calcium-Regulated gene (HSCR)).

### 1.5.4 Mélanges de pesticides

Dans l'environnement, les mollusques ne sont pas soumis à l'exposition d'un seul pesticide mais plutôt d'un mélange de plusieurs molécules. Afin de mimer au mieux les conditions environnementales et d'étudier de possibles interactions entre molécules, certaines études se sont attachées à étudier les effets de cocktails de plusieurs pesticides sur les mollusques. Collin *et al.* (2010) ont montré des changements dans l'expression de certains gènes suite à l'exposition de *C. virginica* à un mélange de lindane, métolachlor et carbofuran. L'étude de Gagnaire *et al.* (2007) sur l'effet d'un mélange de 8 pesticides (atrazine, glyphosate, alachlor, metolachlor, fosetyl-aluminium, terbutylazine, diuron et carbaryl) s'est intéressée chez *C. gigas* à l'expression de certains gènes ainsi qu'à l'étude de différents paramètres hématocytaires (viabilité, activités enzymatiques et phagocytose) et la résistance des huîtres à un challenge bactérien (*Vibrio splendidus*). Les résultats obtenus dans cette étude ont montré une baisse significative de l'expression des gènes sélectionnés après 7 jours d'exposition au mélange de pesticides ainsi qu'une surmortalité des huîtres exposées lorsque celles-ci sont soumises à un challenge bactérien. Des gènes impliqués dans des fonctions différentes (détoxification, métabolisme, système immunitaire) se sont révélés surexprimés chez des adultes de *C. gigas* exposés à un mélange de trois herbicides (atrazine, diuron et isoproturon) pendant 30 jours (Tanguy *et al.*, 2005a). Récemment Greco *et al.* (2011) ont étudié les effets combinés de différentes températures et d'une formulation de pesticides à base de 2,4-D, mécoprop et de 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) chez la mye *Mya arenaria*, pendant une période de 28 jours. Parmi les nombreux biomarqueurs mis en place dans cette étude (indices de condition, indice gonado-somatique, activités enzymatiques, phagocytose...), il est intéressant de noter la hausse de l'indice gonado-somatique et des indices de conditions chez les individus exposés au mélange de pesticides par rapport aux témoins exposés à 18°C.

## 1.6 Biomarqueurs utilisés dans la thèse

### 1.6.1 Approche *in vitro*

L'utilisation d'approches *in vitro* est une bonne alternative à l'utilisation d'animaux entiers et cette démarche est préconisée par la DCSMM. En effet, même s'il n'existe pas à ce jour de lignée cellulaire chez les mollusques, le nombre de cellules qu'il est possible de prélever sur un animal peut permettre, grâce à la mise en place de cultures



primaires, de tester de nombreuses conditions différentes. Ainsi, cette approche permet de réduire le nombre d'animaux utilisés et donc le coût des expériences tout en augmentant la fiabilité des résultats (en baissant la variabilité) (Latire *et al.*, 2012).

### Les hémocytes

Chez les gastéropodes et les autres classes de mollusques, les cellules circulantes qui irriguent les organes et les tissus sont appelées hémocytes (Sminia, 1981). Ces cellules possèdent de nombreuses fonctions telles que la réparation tissulaire et coquillière (Serpentini *et al.*, 2000; Fleury *et al.*, 2008), la digestion ou encore le transport des nutriments (Beninger *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004). De plus, un des rôles majeurs des hémocytes est d'assurer la fonction de défense interne des mollusques via la phagocytose et l'encapsulation des pathogènes (Hooper *et al.*, 2007), ainsi que par l'accumulation et la détoxification des contaminants (Matozzo *et al.*, 2001; Fisher, 2004; Gagnaire, 2005). Chez les mollusques, il existe différents types d'hémocytes qui sont au nombre de cinq chez *C. gigas* : granulocytes acidophiles, granulocytes basophiles, cellules vésiculeuse, hyalinocytes et cellules de type "blast-like" (Chang *et al.*, 2005). Chez *Haliotis tuberculata*, Travers et ses collaborateurs (2008) ont mis en évidence un seul type : les hyalinocytes que l'on peut sub-diviser en deux classes de tailles différentes : 1% de petits hyalinocytes (cellules "blast-like") et 99% de "grands" hyalinocytes.

### Viabilité cellulaire

La première étape dans l'évaluation de la toxicité d'un composé *in vitro* consiste généralement à en étudier l'effet sur la viabilité cellulaire. Plusieurs tests de viabilité existent et parmi eux, les tests mesurant l'activité mitochondriale sont couramment utilisés (test MTT, test XTT, test WST-1). Le principe de ces tests consiste à mesurer la quantité de formazan formé par réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT), du 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT) ou du 4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène disulfonate (WST-1) par les mitochondries des cellules vivantes. La quantité de formazan formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes mais aussi au niveau d'activité métabolique de chaque cellule.

Gasnier *et al.* (2009) et Mesnage *et al.* (2012) ont ainsi utilisé le test MTT pour montrer la toxicité des formulations commerciales à base de glyphosate ou de leurs adjuvants sur différentes lignées de cellules humaines. Les tests de viabilité ont aussi été utilisés chez les bivalves pour évaluer l'effet, sur la viabilité des hémocytes, de différents

composés tels que les produits anti-salissures (Domart-Coulon *et al.*, 2000) (*C. gigas* et *Ruditapes decussatus*) ou encore les sédiments pollués (Chu *et al.*, 2002) (*C. virginica*). Chez le gastéropode *H. tuberculata* exposé à des métaux, une baisse de la viabilité a été observée à partir d'une dose de 100  $\mu\text{M}$  de chlorure de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) (Mottin *et al.*, 2010) et dès la dose de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) (Latire *et al.*, 2012). Grâce à l'utilisation du XTT, Gaume *et al.* (2012) ont montré que le triclosan, produit utilisé comme agent anti-bactérien dans les produits de soin personnel, diminuait l'activité métabolique des cellules de branchies et des hémocytes d'ormeaux avec une  $\text{LC}_{50}$  de 6  $\mu\text{M}$ .

#### Système lysosomal : Test de Rétention du Rouge Neutre (TRRN)

Les lysosomes sont des organites cellulaires mesurant de 0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$  et localisés dans le cytosol de toutes les cellules animales eucaryotes, exception faite des hématies des mammifères. Les lysosomes sont délimités par une membrane lipoprotéique semi-perméable et ils contiennent une soixantaine d'enzymes, les hydrolases acides, qui peuvent digérer toutes les classes de macromolécules (Lowe et Fossato, 2000). Pour fonctionner de façon optimale, ces enzymes nécessitent un pH acide (compris entre 3,5 et 5) qui est maintenu par des pompes à protons membranaires  $\text{ATP/Mg}^{2+}$  dépendantes (Maillet, 2006). Les lysosomes ont de multiples rôles ; ils interviennent dans la dégradation des organelles endommagés (turn-over intracellulaire), dans la digestion du matériel de phagocytose et d'endocytose (Moore *et al.*, 2006) mais également dans la séquestration des agents pathogènes, des métaux et des polluants organiques pouvant potentiellement endommager les cellules (Lowe et Fossato, 2000; Dailianis *et al.*, 2003). Une exposition des cellules à des polluants peut fragiliser les membranes lysosomales. En effet, l'augmentation des activités enzymatiques de détoxification peut entraîner une bioactivation du polluant et une surproduction de radicaux libres qui endommagent les lysosomes et provoquent le relargage de leur contenu dans le cytoplasme de la cellule (Pellerin-Massicotte et Tremblay, 1998) (Figure 1.16). De même, les lysosomes peuvent accumuler différents polluants organiques et inorganiques jusqu'à ce que leur capacité de stockage soit dépassée. Ainsi, la diminution de la stabilité membranaire des lysosomes est un bon marqueur de l'exposition à divers composés xénobiotiques tels que les métaux (Ringwood *et al.*, 1999), les HAPs (Lowe *et al.*, 1995), les composés pharmaceutiques (Martin-Diaz *et al.*, 2009), les pesticides (Canty *et al.*, 2007) ou, de manière plus générale, les environnements pollués (Rank *et al.*, 2007; Buisson *et al.*, 2008). Néanmoins, elle peut aussi être associée à d'autres facteurs de stress environ-

nementaux tels que les variations de température ou de salinité (Hauton *et al.*, 1998), l'exposition à l'air (Song *et al.*, 2007a) mais aussi à des facteurs de stress physiologiques tels que la ponte (Cho et Jeong, 2005; Song *et al.*, 2007b).

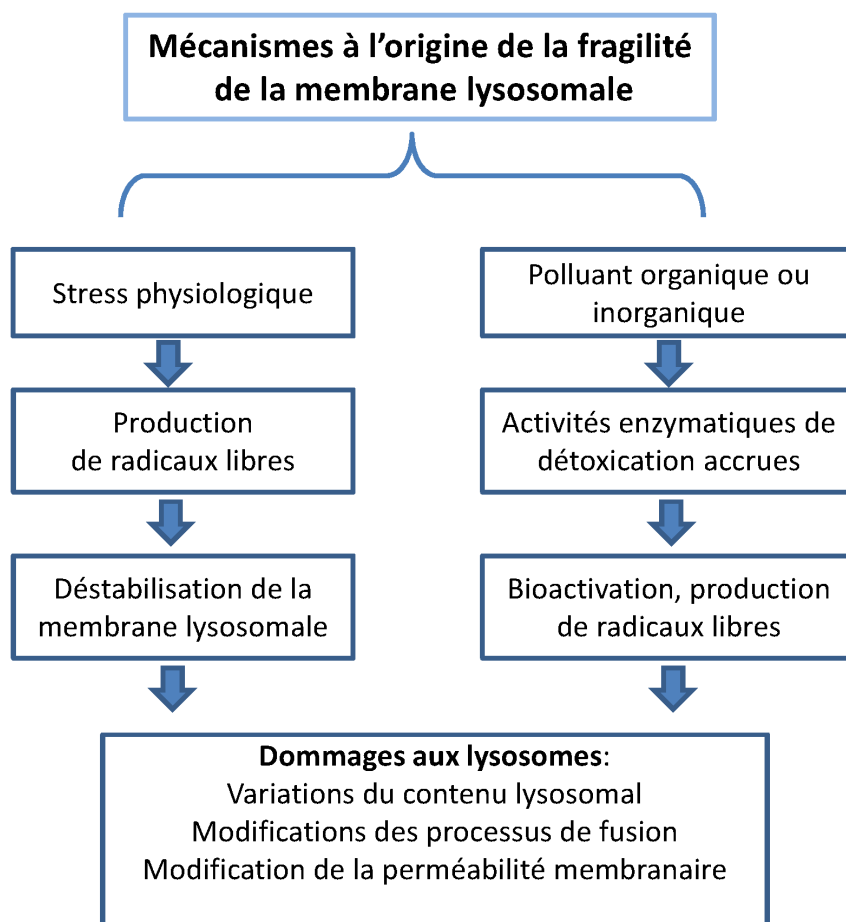


FIGURE 1.16 – Schéma des mécanismes de déstabilisation des lysosomes. Modifié d'après Pellerin-Massicotte et Tremblay (1998)

### Phagocytose

Dans l'état actuel des connaissances, il semble que les invertébrés ne soient capables que de réponse immunitaire de type innée et que la phagocytose est un des modes de défense cellulaire essentiels. Chez *H. tuberculata*, la fonction de phagocytose est assurée par les "grands" hyalinocytes tandis que les cellules de type "blast like" ne semblent pas en être capables (Travers, 2008). Il est possible de distinguer 4 phases différentes durant le processus de phagocytose : la reconnaissance des particules étrangères, l'attachement à celles-ci, l'internalisation et enfin la dégradation de ces particules (Delaporte, 2005 + Figure 1.17). Du fait de leur rôle central dans l'immunité des mollusques, les hémocytes et tout particulièrement leur capacité de phagocytose ont été largement étudiés dans les travaux d'écotoxicologie. En effet si un contaminant est toxique pour

les hémocytes, c'est la survie de l'animal qui est potentiellement mise en jeu (Matozzo *et al.*, 2001). Bado-Nilles *et al.* (2008) ont montré l'effet négatif de deux HAPs (pyréne et fluoranthène) testés à des concentrations environnementales sur l'activité de phagocytose d'hémocytes de *C. gigas*. L'effet inhibiteur d'un mélange de pesticides (diuron, isoproturon) et d'un composé pharmaceutique (ibuprofen) a été démontré sur la phagocytose d'hémocytes de *C. gigas* (Luna-Acosta *et al.*, 2012). Chez les ormeaux, Cheng et ses collaborateurs (2004) ont étudié l'effet de différentes salinités sur la capacité de phagocytose. Ces auteurs ont révélé une baisse significative de la phagocytose chez *Haliotis diversicolor* lorsque la salinité diminue. Récemment, les effets du zinc (Mottin *et al.*, 2010) et du cadmium (Latire *et al.*, 2012) ont été considérés chez *Haliotis tuberculata* : à la concentration de 1000  $\mu\text{M}$ , le zinc a provoqué une inhibition significative de la phagocytose et le cadmium a légèrement diminué la phagocytose à partir de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### Production de Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DROs)

Les DROs ou ROS (Reactive Oxygen Species) correspondent à un groupe de composés comprenant notamment l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$ , le radical hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$ , l'anion hydroxyde  $\text{OH}^-$ , l'oxyde nitrique  $\text{NO}$  ainsi que le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces composés sont naturellement produits par le métabolisme aérobie et sont indispensables pour la réalisation de certaines activités enzymatiques. Dans les hémocytes, la production de DROs est couplée au processus de phagocytose et sert à la dégradation des particules phagocytées. Bien qu'indispensable, la production de DROs par le métabolisme cellulaire doit rester équilibrée. Les DROs sont extrêmement réactifs et si la balance oxydative est déséquilibrée du côté d'une production excessive de DROs, ces composés peuvent endommager les molécules voisines et provoquer de graves dommages aux cellules. En revanche, si la balance est déséquilibrée du côté de l'inhibition des DROs, l'élimination des particules phagocytées ne pourra pas avoir lieu. Baier-Anderson et Anderson (2000) ont montré une inhibition de type dose-dépendante de la production de DROs après une exposition au chlorothalonil chez l'huître *C. virginica*. Le même type de résultat a été observé par Mottin *et al.* (2010) après une exposition d'hémocytes d'*H. tuberculata* à une gamme de concentrations en chlorure de zinc. Au contraire, Gagnaire *et al.* (2006) ont observé une stimulation de la production de DROs chez les hémocytes d'huîtres exposés pendant 4h à l'insecticide paraoxon (400  $\mu\text{mol.L}$ ). De même, Latire et ses collaborateurs (2012) ont noté une stimulation par le chlorure de cadmium de la production des DROs de manière dose-

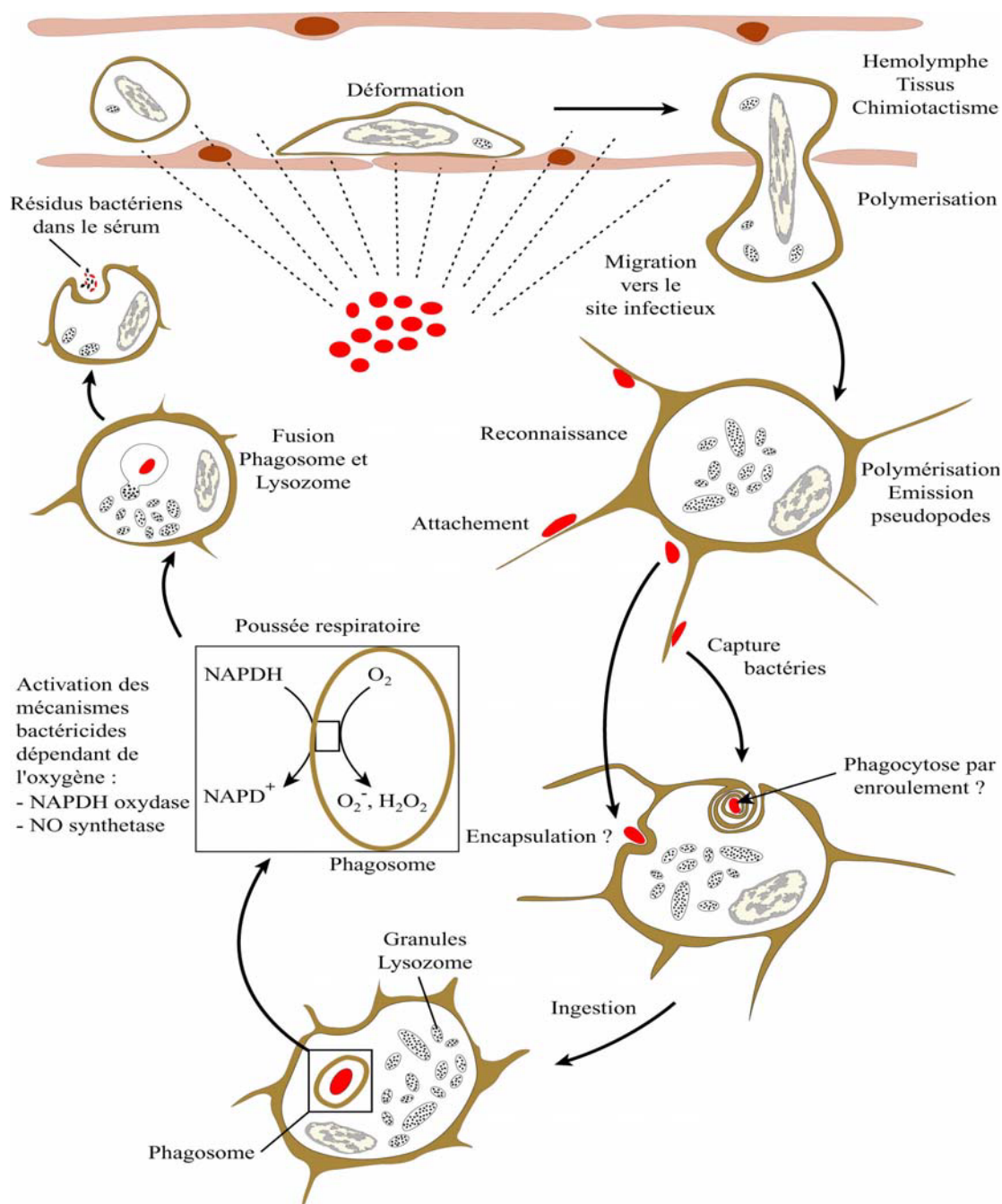


FIGURE 1.17 – Schéma représentant les différentes phases du processus de phagocytose . D'après Paillard (2004)

dépendante, chez les hémocytes d'*H. tuberculata* après 10 jours d'exposition.

## 1.6.2 Approche *in vivo* : tests embryo-larvaires

### Test d'embryotoxicité

Le test d'embryotoxicité est un bio-essai qui a été utilisé pour appréhender l'effet d'un contaminant, ou d'un mélange de contaminants provenant de sédiments pollués, sur le développement précoce d'embryons de moules, *Mytilus edulis* ou d'huîtres, *Crassostrea gigas*. Ce bio-essai, développé pour la première fois par Woelke (1972), a

bénéficié d'une normalisation aux États-Unis dès 1991 (ASTM, 1991) et, plus récemment, au niveau français (AFNOR, 2009). Il a été notamment mis en œuvre pour tester l'effet embryotoxique de métaux (Martin *et al.*, 1981; His *et al.*, 1999; Mai *et al.*, 2012; Mamindy-Pajany *et al.*, 2013), d'alkylphénols (Nice *et al.*, 2000; Amara, 2012), de HAPs (Lyons *et al.*, 2002; Wessel *et al.*, 2007), de peptides fongiques (Poirier *et al.*, 2007), d'hormones de synthèse (Wessel *et al.*, 2007) mais aussi de différentes classes de pesticides et composés apparentés (Robert *et al.*, 1986; His *et al.*, 1999; Wessel *et al.*, 2007; Akcha *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2012) (tableau article méco). Ce bio-essai a aussi été développé pour tester l'effet d'élutriats, de décantats ou encore d'extraits organiques provenant de sédiments pollués. Ainsi dès 1983, Chapman et Morgan (1983) ont développé une méthodologie dans le but d'appréhender la qualité d'un sédiment qui par la suite a prouvé son utilité dans la détection de sédiments toxiques, avant ou après remédiation (Chapman et Morgan, 1983; Long et Chapman, 1985; Williams *et al.*, 1986; Van Den Hurk, 1994; Beiras et His, 1995; Geffard *et al.*, 2002; Cachot *et al.*, 2006; Libralato *et al.*, 2008; Mamindy-Pajany *et al.*, 2010).

#### Test de la métamorphose

Les tests visant à étudier l'effet de contaminants (métaux) sur la fixation et/ou la métamorphose de larves de bivalves ont été utilisés à partir des années 1970-1980 (Boyden *et al.*, 1975; Watling, 1983). Ces auteurs n'avaient pas recours à des neurotransmetteurs pour induire la métamorphose. Depuis, différents travaux ont montré que la métamorphose pouvait être induite chez les larves compétentes ( $\approx$  21 jours PF) par divers neurotransmetteurs tels que la L-DOPA (L-3,4-DihydroxyPhenylAlanine) et les catécholamines (épinephrine et norépinephrine) (Coon *et al.*, 1985; Beiras et Widdows, 1995; García-Lavandeira *et al.*, 2005), la sérotonine, la dopamine (Beiras et Widdows, 1995) ou encore le GABA (acide  $\gamma$  amino butyrique) (Beiras et Widdows, 1995; García-Lavandeira *et al.*, 2005). Le fait de pouvoir déclencher la métamorphose des larves compétentes a donc été mis à profit pour étudier l'action des polluants ou de sédiments pollués (Fitt *et al.*, 1990; Beiras et His, 1994; His *et al.*, 1997b) mais ce bioessai reste néanmoins peu utilisé en écotoxicologie.

### 1.6.3 Approche *in vivo* : biomarqueurs étudiés lors des expositions subchroniques

Selon l'Observatoire des Résidus de Pesticides (ORP), la toxicité aigüe peut être définie comme étant *les effets nocifs résultant de l'exposition à une seule forte dose d'un produit*

ou d'une seule exposition à celui-ci (ORP, 2013). Selon cette même source, la toxicité chronique concerne les effets néfastes sur la santé de l'animal ou de l'homme après plusieurs expositions et à long terme tandis que la toxicité subchronique résulte d'une exposition répétée ou prolongée des animaux d'expérience pendant plusieurs semaines (en général 28 jours) jusqu'à 3 mois (90 jours). Cependant, il est parfois considéré que l'exposition prolongée d'organismes pendant toute la durée d'un stade (telle que le début de la vie sessile chez *C. gigas*) peut être qualifiée d'exposition chronique (Devos *et al.*, 2012).

Lors d'expositions aiguës (temps courts-fortes doses), le paramètre écotoxicologique classiquement calculé correspond à la concentration de contaminant létale pour 50% de la population ( $CL_{50}$ ). Ainsi chez la crevette *Palaemonetes pugio*, la  $CL_{50}$  calculée à 96h pour les stades larvaire et adultes exposés à l'insecticide fipronil s'élevait respectivement à 0,68 et 0,32  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Key *et al.*, 2007). Exposées au même insecticide pendant 28 jours, des huîtres adultes (*C. virginica*) n'ont pas présenté de mortalité, y compris à la dose la plus élevée de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Wirth *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent la relative résistance des huîtres aux contaminants comme l'a montré Farcy (2006) par rapport aux radionucléides. De plus si la survie des organismes n'est pas affectée, il apparaît tout particulièrement nécessaire de considérer des effets subléthaux à différents niveaux d'organisation du vivant.

### Croissance

La mesure de la croissance, quelle soit pondérale ou relative à la taille des individus, est importante car elle intègre l'ensemble des variations physiologiques au niveau d'un animal entier. En effet, la variation des biomarqueurs aux niveaux moléculaire ou cellulaire chez un individu exposé par rapport à un individu contrôle n'implique pas forcément un effet délétère au niveau individuel car la machinerie cellulaire et les mécanismes de réparation peuvent être suffisamment performants pour maintenir un état d'homéostasie. Certains biomarqueurs moléculaires peuvent être qualifiés de biomarqueurs d'exposition tandis que la mesure des variations de croissance pourra être qualifiée de biomarqueur d'effet. Dans l'article publié par Devos *et al.* (2012), la mesure de croissance de jeune naissain d'huître *C. gigas* après exposition pendant 70 jours à du chlorure de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) s'est avérée plus sensible que la mesure de l'expression de certains gènes. Chez *Ruditapes decussatus* exposé à la dose de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre pendant 20 jours, un Scope For Growth (SFG) diminué par rapport à celui des palourdes témoins a été observé en lien avec une baisse du taux de filtration et une augmentation de la respiration (Sobral et Widdows, 1997). La transplantation d'huîtres *C. virginica*

dans une baie contaminée notamment par l'endosulfan a provoqué après 60 jours, une diminution de l'indice de condition (traduisant le remplissage de la coquille par la chair) en comparaison aux huîtres de références (Scott *et al.*, 2002). À l'inverse, Fisher et ses collaborateurs (2000) ont noté une surcroissance d'huîtres (*C. virginica*) placées dans des sites très pollués mais présentant une richesse trophique importante. Le caractère intégrateur de la croissance peut rendre difficile l'interprétation de résultats biologiques acquis sur le terrain.

#### État des tissus et reproduction évalués histologiquement

Les huîtres possédant une gonade diffuse, les techniques d'histologie permettent de sexer les animaux et d'observer les tissus reproducteurs. L'histologie est également adaptée pour évaluer les dommages que peuvent engendrer les contaminants sur les tissus d'animaux exposés. L'observation des lésions tissulaires chez des individus provenant du milieu naturel est une approche qui ne permet pas de faire la différence entre les dommages engendrés par des événements infectieux de ceux associés à l'exposition à des substances toxiques (Bodin *et al.*, 2004). Cependant, certaines études ont montré clairement le lien entre l'exposition à des xénobiotiques et les dommages tissulaires. Syasina *et al.* (1997) ont observé des altérations des tubules de la glande digestive chez le bivalve *Mizuhopecten yessoensis* en corrélation avec la présence de fortes concentrations en métaux dans des sites pollués de la mer du Japon. Une augmentation du nombre de granulocytes et de la vacuolisation des cellules de la paroi des tubules digestifs ainsi qu'une réduction du tissu conjonctif ont été rapportées chez des moules (*M. edulis*) encagées dans des sites pollués (Wedderburn *et al.*, 2000). Des dommages importants des tissus digestif, connectif, musculaire et nerveux d'individus de *Crenomytilus grayanus* provenant de la mer du Japon ont été associés à l'exposition *in situ* par des métaux et des pesticides organochlorés (DDT) (Usheva *et al.*, 2006). Amachree *et al.* (2013) ont mis en évidence des processus d'inflammation correspondant à des infiltrations hémocytaires chez *M. edulis* exposé expérimentalement à du cadmium.

L'exposition à certains types de contaminants peut conduire à des perturbations au niveau de la fonction reproductrice. Un des exemples les plus connus est celui des Tri-ButyléTains (TBTs) qui ont été utilisés dans la production de peintures anti-salissures et provoquent une masculinisation des femelles (imposex) tout d'abord décrite chez *Nucella lapillus* par Blaber (1970) et observée chez de nombreuses espèces de gastéropodes marins (Ketata *et al.*, 2008). Chez *M. edulis* provenant du port de Halifax au Canada, Yeats *et al.* (2008) ont observé un sex-ratio en faveur des mâles qui semblerait associé



à la présence de TBTs. D'autres contaminants induisent des effets sur la reproduction des mollusques. Ainsi, une inhibition de la croissance des tubules gonadiques chez les mâles et les femelles, ainsi qu'une stimulation de la ponte ont été observés après exposition de *M. edulis* à une concentration subléthale de cadmium (Kluytmans *et al.*, 1988). Binelli *et al.* (2001) ont rapporté un effet du DDT sur la dégénérescence des ovocytes ainsi qu'une stimulation de la ponte d'individus de *D. polymorpha* du lac Majeur. Des moules exposées à un mélange d'hydrocarbures (North Sea Oil ; NSO) montraient une maturation sexuelle précoce chez les femelles tandis que les individus exposés à un mélange combiné de NSO, HAPs et alkylphénols présentaient un nombre important de tubules gonadiques dégénérés (Aarab *et al.*, 2004). L'effet de ces mêmes contaminants (NSO, HAPs) a été étudié par Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville (2006) chez *M. edulis*. Par rapport au groupe témoin, le NSO a provoqué un développement moins important de la gonade des femelles tandis que le mélange du NSO et des HAPs a engendré une atrophie des ovocytes.

### Activités enzymatiques

L'exposition à des xénobiotiques ou le déséquilibre de la balance oxydative peuvent avoir des conséquences graves pour les organismes. Les cellules des mollusques possèdent cependant un ensemble de systèmes de défense afin de lutter contre les dommages directs des xénobiotiques ou ceux engendrés par les DROs (oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN). Ainsi, dans la réponse cellulaire liée à la présence de xénobiotiques, des enzymes interviennent à différents niveaux et il est possible de les classer selon trois phases distinctes :

- les enzymes de phase I permettent l'oxydation des xénobiotiques en les rendant plus polaires et facilement éliminables. Ces enzymes sont notamment représentées par l'ensemble des cytochromes P450 ;
- les enzymes de phase II assurent la conjugaison des xénobiotiques avec différents groupements (acide D glucuronique, sulfate, méthyle, acétyl et glutathion). Parmi ces enzymes, les Glutathion-S-transférases (GSTs) assurent la conjugaison du glutathion (peptide antioxydant sous sa forme réduite) aux contaminants afin d'en faciliter l'élimination ;
- les enzymes de phase III permettent le transport actif des xénobiotiques ayant subi les transformations lors des phases I et II hors de la cellule. Chez les mollusques, ces enzymes font partie du système de résistance MXR (Multi Xenobiotic Resistance) qui induit une baisse de la concentration intracellulaire de nombreux

composés toxiques et qui a été décrit notamment chez *C. gigas* (Minier *et al.*, 2002). La lutte contre les radicaux libres (dont les DROs) est réalisée par différents composés (polyphénols, caroténoïdes, glutathion, métallothionéines, vitamines C, E et Q) ainsi que par des enzymes spécifiques : les SuperOxyde Dismutases (SODs) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en oxygène moléculaire ( $O_2$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ; les Glutathion PeroXydases (GPXs) qui assurent la transformation des hydroperoxydes de type ROOH en ROH et les CATalases (CATs) qui catalysent la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau ( $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ ). Cependant, lorsque les capacités des systèmes de lutte sont dépassées, des phénomènes tels que la peroxydation des lipides peuvent se produire. Le Malondialdéhyde (MDA), produit de la peroxydation lipidique, est un marqueur du stress oxydant qui est issu notamment de l'action des DROs sur les acides gras polyinsaturés.

L'effet des contaminants sur l'activité de la GST a été étudié chez différentes espèces de mollusques, notamment *M. galloprovincialis* par Fitzpatrick *et al.* (1995) et Tim-Tim *et al.* (2009) ; *R. decussatus* par Hoarau *et al.* (2001) ; *Nucella lapillus* et *Monodonta lineata* par Tim-Tim *et al.* (2009). Cependant, l'effet des xénobiotiques est souvent évalué en étudiant les activités combinées d'enzymes de détoxification (GSTs) et de régulation du stress oxydant (CATs) : Akcha *et al.* (2000) (*M. edulis*, benzo[a]pyrene) ; Alves *et al.* (2002a) (*Perna perna* et *Crassostrea rhizophorae*, furandane) ; da Silva *et al.* (2005) (*C. rhizophorae*, huile de diesel). En plus des activités des enzymes telles que les GSTs et catalases, certains auteurs se sont intéressés à la quantité de MDA afin d'évaluer la peroxydation lipidique : Roméo *et al.* (2003) (*M. galloprovincialis*, pollution métallique portuaire) ; Damiens *et al.* (2004) (larves de *C. gigas*, carbofuran et malathion) ; Funes *et al.* (2006) (*M. galloprovincialis* et *C. angulata*, pollution métallique portuaire) ; Damiens *et al.* (2007) (*M. galloprovincialis*, pollution métallique) et Canesi *et al.* (2008) (*M. galloprovincialis*, mélange de disrupteurs endocriniens).

#### Expression de gènes au niveau transcriptionnel

Un des effets les plus précoces qui peut être provoqué par l'exposition d'un organisme à un contaminant se situe au niveau transcriptionnel. L'induction précoce de différentes fonctions cellulaires peut être mise en évidence notamment grâce aux méthodes de quantification des ARN<sub>m</sub> par PCR (Polymérase Chain Reaction) en temps réel (RT-PCR). L'induction de gènes au niveau transcriptionnel donne des informations précieuses sur les régulations précoces qui se mettent en place lors de l'exposition

à un polluant mais il faut s'intéresser parallèlement aux protéines correspondantes qui restent les unités fonctionnelles dans les cellules. Beaucoup de fonctions peuvent être étudiées au niveau transcriptionnel ; Tanguy *et al.* (2005a) ont étudié la réponse de *C. gigas* exposé à un mélange d'herbicides (atrazine, diuron et isoproturon) et au glyphosate seul. Grâce à l'utilisation d'une méthode de type SSH (Suppression Subtractive Hybridation), ces auteurs rapportent un total de 137 séquences de gènes régulés de manière différente après exposition aux herbicides et ces gènes sont associés à des fonctions cellulaires variées (détoxication, régulation des protéines et des acides nucléiques, respiration, communication cellulaire, dynamique du cytosquelette, métabolisme énergétique). Après sélection des séquences surexprimées, Tanguy *et al.* (2005a) ont étudié spécifiquement certains gènes et ont montré l'importance de la glande digestive dans la détoxication des xénobiotiques. Des travaux impliquant les régulations au niveau transcriptionnel après exposition à des mélanges de pesticides ont été menés par Gagnaire *et al.* (2007) et Collin *et al.* (2010) chez *C. gigas* et par Dondero *et al.* (2010) chez *M. edulis*. Farcy (2006) a étudié la régulation transcriptionnelle après exposition de *C. gigas* aux radionucléides de différents gènes impliqués dans des fonctions variées : métallothionéines (MTs), SOD, P53, protéines chaperonnes (HSC72, HSP70, HSP90), CYtochrome-P-450 (CYP450), MXR, actine, 18S, GAPDH. C'est sur la base de ces travaux qu'a été faite l'étude de la régulation transcriptionnelle des huîtres après exposition au glyphosate dans la présente thèse.

## 1.7 Objectifs de la thèse

Dans le cadre du projet CHRONEXPO, les travaux effectués pendant ma thèse ont visé à étudier les "effets de l'exposition aux herbicides chez des Mollusques marins exploités" en utilisant une "approche *in vitro* chez l'ormeau, *Haliotis tuberculata*" et une approche "*in vivo* chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*".

Le choix des molécules étudiées s'est porté sur le glyphosate qui, selon les données récentes d'analyses de l'eau dans les rivières françaises, est la matière active la plus quantifiée (Commissariat Général au Développement Durable, 2013). Afin de pouvoir évaluer de façon la plus complète possible l'effet de cette matière active, divers composés associés ont été pris en compte. Une partie des expérimentations s'est donc intéressée aux effets de l'AMPA qui est le métabolite le plus quantifié dans les cours d'eau de France métropolitaine. De plus les effets des formulations commerciales à base de glyphosate et des adjuvants seuls ont été évalués grâce à l'utilisation de diffé-

rentes approches. Un autre ensemble de molécules herbicides composés de deux matières actives (mecoprop et mecoprop-p) et de leur produit de dégradation (2-Méthyl-4-ChloroPhénol) ont été étudiés uniquement sur deux stades larvaires de *C. gigas*.

Les objectifs de la thèse étaient :

- de comprendre les modes d'action d'herbicides et de composés apparentés au niveau cellulaire après exposition *in vitro* d'hémocytes provenant d'un gastéropode marin *H. tuberculata* ;
- d'évaluer les effets d'une contamination par des herbicides sur les stades de développement précoces et lors d'un processus de transformation crucial (métamorphose) chez *C. gigas* ;
- de déterminer la toxicité d'herbicides à différents niveaux d'organisation du vivant lors d'expositions subchroniques de juvéniles de *C. gigas*.

D'une manière plus générale, ces recherches ont été entreprises dans le but de déterminer si les molécules herbicides parmi les plus utilisées pouvaient représenter un risque au niveau environnemental. Les travaux ont été également effectués dans l'optique de pouvoir donner, à notre échelle, des recommandations pour l'utilisation et la réglementation concernant ces composés.

Les recherches effectuées *in vitro* visaient à évaluer l'effet de pesticides sur les paramètres hématocytaires d'*Haliothis tuberculata*. Différents paramètres tels que la mortalité, la phagocytose, la déstabilisation du système lysosomal ou encore la production de Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DROs) ont été étudiés après une contamination *in vitro* par des pesticides et des composés apparentés : glyphosate, Roundup EXpress® (R<sub>EX</sub>) et POLy-Ethoxylated tallow Amine (POEAs). Ces travaux font l'objet de la deuxième partie de la thèse et ont permis la réalisation d'un article en préparation pour la revue "Toxicology in Vitro".

*Le travail sur les hémocytes et les paramètres immunitaires a commencé dès le début de la thèse, avec la participation aux travaux du Dr. Thomas Latire relatifs aux effets du cadmium sur H. tuberculata et aux recherches du Dr. Elmina Mottin sur l'impact du zinc chez C. gigas. Ces recherches ont fait l'objet de deux publications placées en annexe C.*

Les études *in vivo* ont été séparées en deux volets distincts. Le premier s'est intéressé à l'effet de différentes matières actives, formulations commerciales, produits de dégradation et adjuvant sur le développement de deux stades embryon-larvaires de *C. gigas*. Ces travaux ont permis la rédaction de trois articles différents :

- le premier a été publié dans la revue *Aquatic Toxicology* (Impact factor : 3,73) et les recherches ont porté sur le glyphosate, son métabolite l'AMPA et deux formulations commerciales le R<sub>EX</sub> et le Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>). "Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*" (*Aquatic Toxicology* Volume 128–129, Mars 2013, Pages 67–78) ;
- le deuxième article a été écrit en complément du premier et les recherches concernaient les effets d'un adjuvant à base de POEA : le Genamin T-200. Ce travail a été soumis dans la revue *Journal of Toxicological Sciences* "Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200) on two life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*" ;
- le troisième article s'est attaché à étudier l'effet du MeCoProP (MCP), MeCoProP-P (MCP-P) et du 2-MCP (2-Methyl-4-ChloroPhénol) sur les larves de *C. gigas*. Il a été ressoumis après révision dans la revue *Aquatic Toxicology*. "Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*".

*Ces articles composent le corps de la troisième partie de la thèse*

Le deuxième volet d'études *in vivo* avait pour objectif de répondre à la question de l'effet de l'exposition subchronique à des herbicides sur des juvéniles de *C. gigas*. Pour ce faire, trois contaminants différents ont été testés (glyphosate, R<sub>EX</sub> et POEA) et différents biomarqueurs ont été étudiés :

- mortalité, croissance, indice de condition (approche individuelle) ;
- stades de gamétogenèse, structure du tissu conjonctif, atrophies des tubules de la glande digestive, infiltrations hémocytaires (approche histologique) ;
- activités enzymatiques des Glutathion-S-Transférase (GST), catalase (CAT) et évaluation de la peroxydation lipidique par le dosage du MalonDiAldehyde (MDA)(approche biochimique) ;
- niveau d'expression de gènes d'intérêts : métallothionéines (MTs), SOD, P53, protéines chaperonnes (HSC72, HSP70, HSP90), CYtochrome-P-450 (CYP450), MXR. (approche transcriptomique).

*Les résultats de ces recherches sont présentés dans la quatrième partie de la thèse.*



## Deuxième partie

### **Approche *in vitro* : effets d'herbicides sur les paramètres hémocytaires d'*Haliotis tuberculata***





Cette seconde partie se compose principalement d'un article dans lequel les effets du glyphosate, d'une formulation commerciale à base de glyphosate (Roundup Express®) et d'un des adjuvants les plus couramment utilisés (POLyEthoxylated tal-low Amines : POEA ou suif aminé éthoxylé) ont été étudiés *in vitro*.

Au cours de la thèse, plusieurs essais ont été réalisés afin de maintenir en culture des hémocytes d'huîtres creuses. Ces essais ont porté sur l'utilisation de milieux de culture (Hank's 199, L-15) et de différents types de contenants de culture (plaques et flasques) et sur la densité cellulaire. Des pourcentages de viabilité cellulaire acceptables (jusqu'à 80% de ceux observés en début de culture) n'ont jamais été calculés au delà de 24h. Les cultures primaires d'hémocytes d'ormeau étant bien maîtrisée au laboratoire (Lebel *et al.*, 1996), celles-ci ont été utilisées afin d'étudier les mécanismes de toxicité des différents herbicides et composés apparentés.

## OBJECTIFS

1. Évaluer la toxicité de molécules herbicides et adjuvants sur les hémocytes, cellules particulièrement impliquées dans l'immunité.
2. Comparer la toxicité de matières actives, de formulations commerciales et d'adjuvants.
3. Évaluer la sensibilité des tests *in vitro* qui peuvent constituer une alternative à l'approche *in vivo*.
4. Apporter des éléments de réponse sur les modes d'action des différentes molécules testées au niveau cellulaire.

En plus des données présentées dans l'article ci-après, les résultats relatifs aux dérivés réactifs de l'oxygène sont compilés dans les annexes du présent document car ces premiers résultats nécessitent un travail complémentaire pour en tirer des conclusions définitives.

Ma participation aux travaux sur les effets du cadmium *in vitro* chez *H. tuberculata* a été valorisée par la publication d'un article dans *Aquatic Toxicology* présenté en annexe C (Latire *et al.*, 2012).

RECAPITULATIF DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL MIS EN OEUVRE

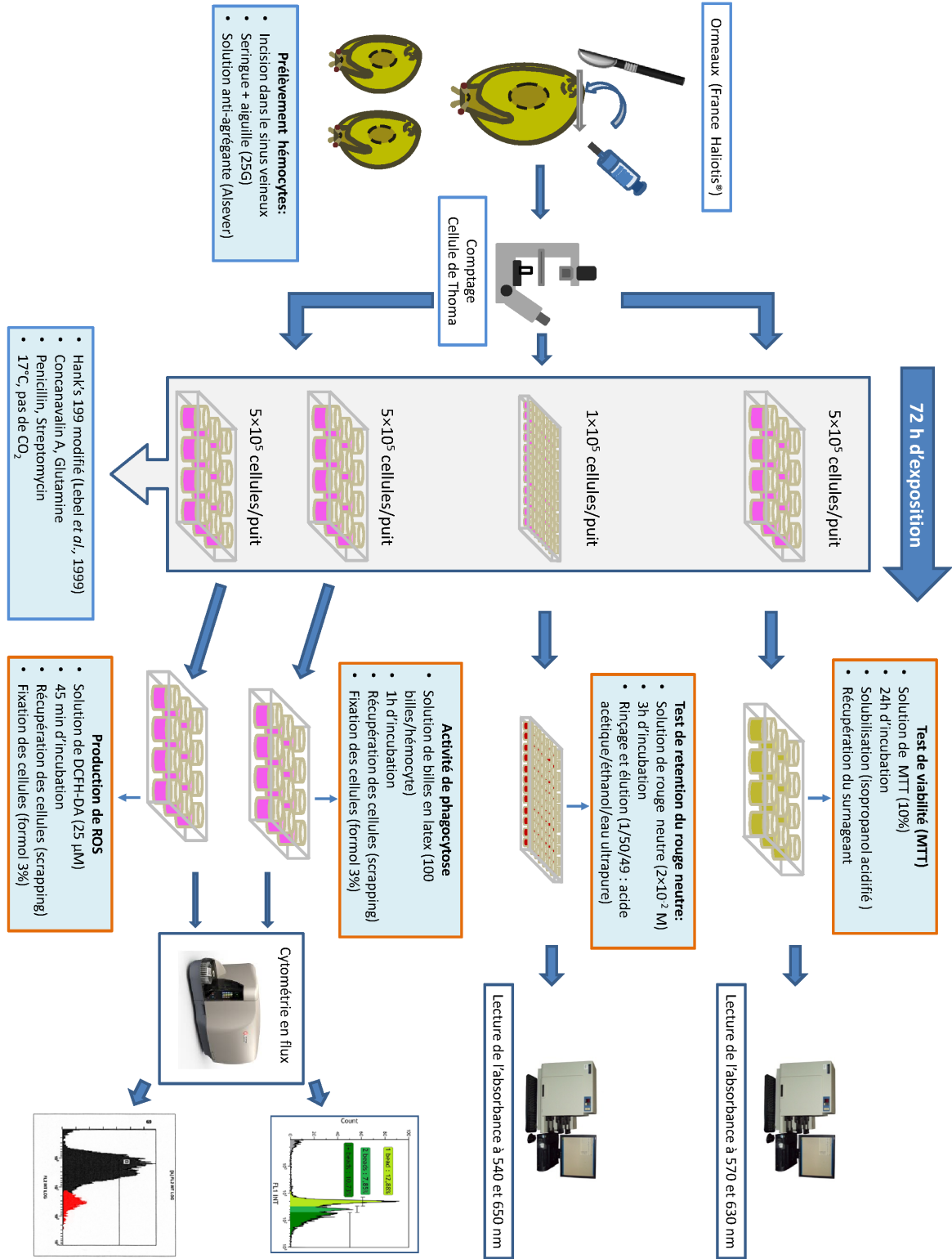


FIGURE 1.18 – Schéma récapitulatif des méthodes utilisées pour le prélèvement, l'exposition des hémocytes et les biomarqueurs mis en œuvre pour évaluer l'effet des herbicides *in vitro*.

## Chapitre 2

# ***In vitro* effects of glyphosate-based herbicides and related adjuvants on haemocytes from *Haliotis tuberculata*.**

**Antoine Mottier , Antoine Serpentine, Adèle James, Jean Marc Lebel and Katherine Costil**

*Article en préparation pour la revue Toxicology in Vitro*

### **2.1 Introduction**

The quality of coastal waters greatly depends of human activities in upstream area. Among the various contaminants, pesticides from agricultural and domestic activities could be carried by freshwaters via run-off and leaching processes and contaminate marine coastal areas (Auby *et al.*, 2007; Buisson *et al.*, 2008; Burgeot *et al.*, 2008). Herbicide formulations containing glyphosate as the active ingredient are among the most used pesticides in the world (Howe *et al.*, 2004). In these commercial formulations, adjuvants are used to promote the penetration of the active ingredient into plant cuticles (Relyea, 2005). The most common adjuvants in glyphosate-based herbicides are polyethoxylated tallow amines (POEAs) that could be formulated in an oxide :tallow-amine ratio ranging from 5 :1 to 25 :1. Regarding the hydrolysis (>30 days for pH ranging from 5 to 9) and photolysis time (69 and 77 days, for pH of 7 and 9, respectively) of glyphosate in water, this molecule could be considered as relatively persistent (??). Furthermore, several studies have shown that glyphosate is often detected in rivers (Blanchoud *et al.*, 2007; Botta *et al.*, 2009; Kolpin *et al.*, 2006; Pesce *et al.*, 2008) with maximum

concentrations higher than  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (Puértolas *et al.*, 2010). The half-life of POEAs in water has been estimated by Giesy *et al.* (2000) and ranges from 21 to 42 days which also shows that this adjuvant is relatively persistent in water. Data from literature have indicated that commercial formulations appeared more toxic for a large panel of non-target organisms than glyphosate alone (Folmar *et al.*, 1979; Howe *et al.*, 2004; Mann et Bidwell, 1999; Mottier *et al.*, 2013). Furthermore, toxicity of POEA adjuvants has already been demonstrated in different taxonomic groups such as amphibians (Howe *et al.*, 2004), freshwater crustaceans (Brausch *et al.*, 2007, Brausch and Smith (2007)) or a freshwater mollusc (Bringolf *et al.*, 2007).

The abalone *Haliotis tuberculata* is a marine gastropod species from Europe which can be found from Senegal to Ireland. Abalone species have been used as sensitive species to assess the pollution of coastal areas (Gorski et Nugegoda, 2006; Zhu *et al.*, 2011) or the potential toxicity of chemical compounds (Gaume *et al.*, 2012; Latire *et al.*, 2012; Mottin *et al.*, 2010). In molluscs, the immune system is based on haemocytes which are responsible for many mechanisms such as phagocytosis, pathogen hydrolysis or Reactive Oxygen Species (ROS) production (Donaghy *et al.*, 2010; Galloway et Depledge, 2001; Hooper *et al.*, 2007; Travers *et al.*, 2008). In bivalves, many types of haemocytes have been described such as eosinophilic, basophilic and intermix granulocytes; vesicular and blast-like cells in *Crassostrea gigas* (Chang *et al.*, 2005). By contrast in *H. tuberculata*, Travers *et al.* (2008) have shown only one type of haemocytes : the hyalinocytes, which could be sorted by into blast-like and large cells. Abalone circulatory system is open and the haemocytes constantly exposed to surrounding environments could be affected by the exposure to chemicals. Furthermore, as haemocytes play an essential role in mollusc immunity, the effects of contaminants on these cells could lead to adverse effects for the whole animal.

*In vitro* studies are useful tools to assess the potential risks induced by anthropogenic contaminants in the aquatic environments and provide good alternatives to whole animal testing (Schirmer, 2006). Indeed, they allow assessing the effects of multiple contaminant concentrations from the cells of only one individual; they are easily reproducible and take ethical issues into consideration (Ní Shúilleabháin *et al.*, 2006). Although, the use of *in vitro* tool gives a limited point of view of all the physiological processes that occur at *in vivo* level, cell culture gives precious information on the mechanisms of toxicity (Latire *et al.*, 2012). While several studies focusing on the effects of various contaminants on bivalve haemocytes *in vitro* have been published (Alvarez et

Friedl, 1992; Bado-Nilles *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2006, 2004, 2003; Sauvé *et al.*, 2002), few have been interested in *Haliotis* spp. haemocytes for ecotoxicological investigations. Recently, two studies have demonstrated the adverse effects of metals (cadmium and zinc) on haemocytes in *H. tuberculata* (Latire *et al.*, 2012; Mottin *et al.*, 2010) and Gaume and her collaborators (2012) have studied the effects of triclosan and methyl-triclosan (anti-bacterial agents) on the viability and morphometric aspect of the same type of cells. However, there is a lack of data concerning the effects of herbicides on the haemocytes of gastropods including *H. tuberculata*.

The aims of this study was to assess the *in vitro* effects of 1) glyphosate, 2) a commercial formulation containing glyphosate as the active matter (Roundup Express®) and 3) POEAs adjuvant on haemocytes in *H. tuberculata* after 72h exposure using viability assessment (MTT assay), lysosomal stability (neutral red retention assay) and phagocytosis (flow cytometry approach).

## 2.2 Materials and methods

### 2.2.1 Haemocyte primary culture

Adult abalones of 8-10 cm were provided by France Haliotis® (French Brittany). Before starting any experimentation, the animals were maintained in the Centre Régional d'Etudes Côtières (CREC ; Luc-sur-Mer) in natural sea water with aeration and algae supply, for a minimum of 2 weeks acclimation. Primary cell culture of abalone haemocytes has been previously described by Latire *et al.* (2012), Lebel *et al.* (1996), Mottin *et al.* (2010) and Serpentine *et al.* (2000). Haemocytes were sampled from the adductor muscle of *H. tuberculata*; hemolymph was withdrawn from a medio-lateral incision using a syringe fitted with a 25 gauge needle. In order to avoid any cell aggregation, the syringe was moisturized with an Alserver solution (115 mM glucose ; 27 mM sodium citrate ; 11.5 mM EDTA ; 382 mM NaCl). Hemolymph was transferred to a 15 mL centrifuge tube and diluted 1 :4 with Alserver solution. Haemocytes were counted in triplicate by using a Thoma cell counting chamber. Cells were plated in 12-well culture plates (NUNC® ; Penfield, New York, USA) at the density of  $5 \cdot 10^5$  cells per well (MTT assay and flow cytometry analyses) or in 96-well culture plates (neutral red retention assay) at the density of  $1 \cdot 10^5$  cells per well. Hemolymph solution was diluted with 1 :4 v/v sterile sea water. After 1 h, sea water was removed and replaced by 500  $\mu$ L (12-well plates) or 200  $\mu$ L (96-well plates) of modified Hank's sterile 199 medium (250 mM

NaCl, 10 mM KCl, 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 10 mM Hepes, 2 mM l-glutamine, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 60 µg mL<sup>-1</sup> penicillin G and 2 mM concanavalin ; pH : 7.4). Cells were let for 24h before beginning any pesticide exposure. Cells were then exposed for 72h to the different chemicals and all the cultures were performed in a CO<sub>2</sub> free incubator at 17°C.

### 2.2.2 Studied endpoints

#### MTT assay

The cell viability was estimated using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. This test was adapted to molluscan cell cultures by Domart-Coulon et al. (1994). It measures the capacity of mitochondrial succinyl deshydrogenase in living cells to convert MTT (yellow) into formazan (dark blue). 50 µL of a stock solution (5 mg mL<sup>-1</sup> MTT in 1x PBS) were added to culture dishes (10% v/v). After 24h incubation, 50 µL of acidified (0.04N HCl) isopropanol were added to each dish to dissolve neo-formed formazan. Absorbance was measured at 570 nm with a 630 nm reference, and results were expressed as percentages of viability relative to absorbance of the control group.

#### Neutral red retention assay (NRR)

The stability of lysosomal membranes was assessed by the neutral red retention assay (NRR). Hank's 199 medium was removed and replaced by 300 µL of neutral red working solution (2.10<sup>-2</sup> M neutral red in Molluscan Physiological Saline (MPS) : 4.10<sup>-1</sup> M NaCl ; 1.10<sup>-1</sup> M MgSO<sub>4</sub> ; 2.10<sup>-2</sup> M HEPES ; 1.10<sup>-2</sup> M CaCl<sub>2</sub> ; 1.10<sup>-2</sup> M KCl ). After 3h of incubation in the dark, neutral red solution was removed, cells were gently rinsed with MPS and 200 µL of elution solution (1 :50 :49 v/v/v of acetic acid, absolute ethanol, ultrapure water) were added to each well. Plates were then gently agitated for 30 min in the dark. Optical density of each well was read using a multiplate reader (FlexStation 3<sup>®</sup>, Molecular Devices <sup>TM</sup>; Chicago, USA) at 540 and 650 nm as a reference.

#### Phagocytic activity assessed by flow cytometry

The phagocytic rate of haemocytes was assessed as described by Auffret *et al.* (2006), Latire et al. (2012), Mottin et al. (2010) and Sauvé et al. (2002). Briefly, medium was removed and replaced with 500 µL of pesticide free medium containing fluorescent latex beads (100 carboxylate-modified FluoroSpheres<sup>®</sup>/hemocyte, yellow-green fluo-

rescence, 1  $\mu\text{m}$  diameter, Molecular Probes®). After 1h incubation, medium was removed and cells were rinsed and then gently scrapped in 500  $\mu\text{L}$  MPS. The haemocytes samples were centrifuged 10 min at 500 g and the resulting pellet was delicately fixed in 300  $\mu\text{L}$  of 3% formaldehyde for further analysis. Haemocytes were analysed by using a Gallios™ flow cytometer (Beckman Coulter®). A minimum of 20,000 events was considered for each sample. The level of fluorescence was evaluated using FL1 channel.

### 2.2.3 Exposures to chemicals

In the present study, glyphosate acid (97% purity, CAS number : 1071-83-6) and POEAs mix were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) whereas Roundup Express® ( $R_{\text{EX}}$ ) was purchased from a garden centre. For  $R_{\text{EX}}$ , all the concentrations given in this study were expressed in glyphosate equivalents. All solutions of chemical compounds used were prepared with sterile Hank's M199 medium. For the MTT assay, the tested concentrations were : 0.1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 ; 10,000 and 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (+ control) for glyphosate ; 0.1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 ; 10,000 ; 20,000 ; 40,000 ; 60,000 ; 80,000 and 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (+ control) for  $R_{\text{EX}}$  and 0.064 ; 0.64 ; 6.4 ; 64 ; 640 ; 1280 ; 2560 ; 3840 ; 5120 and 6400  $\mu\text{g L}^{-1}$  (+ control) for POEAs (for which previous experiments have shown null values of MTT up to 64,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). All concentrations were tested at least 4 times (corresponding to 4 animals) in triplicate. For the two other biomarkers, the tested concentrations were chosen according to previous MTT results. Glyphosate concentrations were 0.1, 10,000 and 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (+control).  $R_{\text{EX}}$  and POEAs concentrations were given in the table 2.1. All the concentrations were tested at least 3 times (3 animals) in triplicate.

TABLE 2.1 – Concentrations used for the NRRA and phagocytic activity assessment

	Environmental concentration	$\approx$ NOEC	$\approx$ EC <sub>20</sub> MTT	$\approx$ EC <sub>50</sub> MTT	$\approx$ EC <sub>80</sub> MTT
$R_{\text{EX}}$ concentrations $\mu\text{g L}^{-1}$	0.1	10,000	25,000	42,000	68,000
POEAs concentrations $\mu\text{g L}^{-1}$	0.1	640	1024	1920	3200

### 2.2.4 Statistical analyses

As no data-set met the assumption of normality and homoscedasticity for MTT assay and neutral red retention (+ glyphosate data for phagocytic activities), these data were analysed using non-parametric Kruskal-Wallis (K-W) tests for independent samples. In case of  $H_0$  rejection, an a posteriori Dunn test was used in order to detect

significant differences among the different concentrations. The data about phagocytic activities fulfilled requirements to be analysed by one way ANOVAs followed by a posteriori Student-Newman-Keuls (SNK) tests. The statistical analyses were performed using STATISTICA 8.0 software (Statsoft®, Tulsa, OK, USA). EC50 values were computed with non-linear regressions (Hill equation) using Excel® macro REGTOX (Vindimian, 2012).

## 2.3 Results

### 2.3.1 MTT viability assay

Glyphosate did not induce any decrease in MTT activities even at very high concentrations. The Kruskal-Wallis test gave a p-value of 0.04 but Dunn test could not detect any statistical differences between concentrations and only a trend is illustrated in figure 2.1 A. Exposure to REX® caused an important significant decrease of MTT values ( $p < 0.001$ ) from the concentration of 40,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  with 52% ( $\pm 18.78$ ) of the control viability (Figure 2.1 B). The viability only reached 6.84% ( $\pm 4.75$ ) at 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Non linear regression applied on the data set gave an EC<sub>50</sub> of 41,419.18  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Similar types of results were observed after POEAs exposure with a significant decrease of haemocyte viability ( $p < 0.001$ ) from 1280  $\mu\text{g L}^{-1}$  (67.27% of the control viability,  $\pm 13.74$ ) to the concentration of 6400  $\mu\text{g L}^{-1}$  (3.42% of the control viability,  $\pm 1.93$ ) (Figure 2.1 C). Finally, an EC<sub>50</sub> of 1855.31  $\mu\text{g L}^{-1}$  was calculated for exposures to POEAs.

### 2.3.2 Neutral red retention assay (NRRA)

Low doses of glyphosate (i.e. 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) induced a significant increase ( $\times 1.29$ ) of neutral red retention (NRR) in lysosomes compared to control group whereas the two highest doses of this herbicide (i.e. 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) did not lead to any significant changes in lysosomal stability (Figure 2.2 A) ( $p = 0.0256$ ). A slight but not significant increase of neutral red retention in lysosomes was also observed in haemocytes exposed to the lowest doses of REX (i.e. 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;  $\times 1.27$ ) while above this concentration, NRR greatly decreased and varied from 12.03% ( $\pm 4.80$ ) at 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (NOEC MTT) to 2.74% ( $\pm 5.81$ ) at 68,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 2.2 B) ( $p < 0.001$ ). Finally, POEAs exposure also induced limited but not significant increase of neutral red retention ( $\times 1.19$ ) and huge significant losses of lysosome NRR at the concentrations of 1920



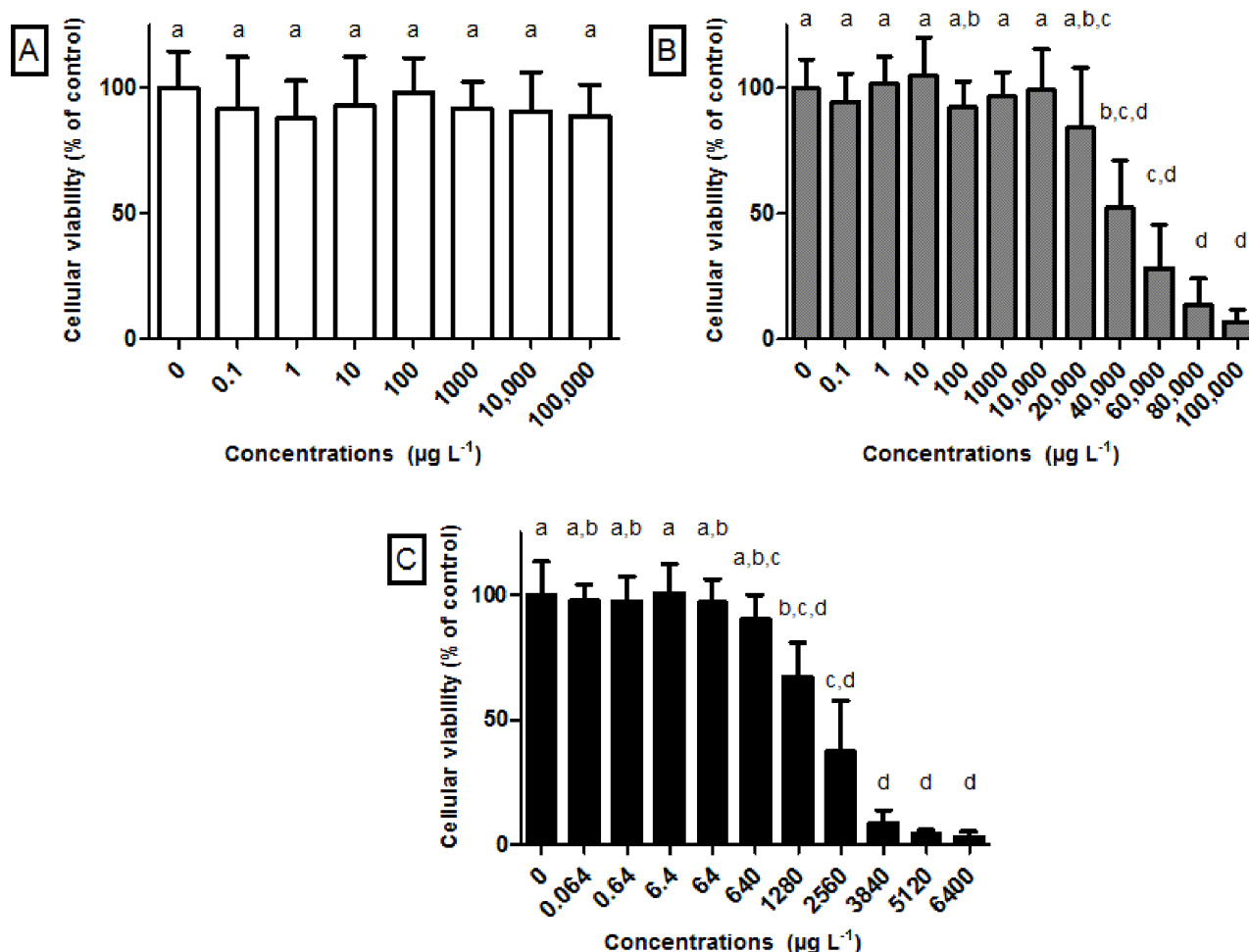


FIGURE 2.1 – Cell viability  $\pm$  standard deviation (in % of values recorded for control group) after 72h exposure to glyphosate (A) Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) (B) and POEAs (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different.

(EC<sub>50</sub> MTT) and 3200  $\mu\text{g L}^{-1}$  with 1.61% ( $\pm$  4.37) and 0.54% ( $\pm$  3.52) of NRR values, respectively (Figure 2.2 B).

### 2.3.3 Phagocytic activities

No significant differences in phagocytic activities were observed after 72h of exposure to glyphosate between control and the other concentrations (Figure 2.3 A). As a slight increase of phagocytic activities was recorded at the dose of 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , haemocytes exposed to this concentration significantly differed from those exposed to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Phagocytic activities significantly decreased after exposures to 10,000 (NOEC MTT); 25,000; 42,000 and 68,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of R<sub>EX</sub> (SNK  $p < 0.05$ ) (Figure 2.3 B). The highest inhibition of phagocytosis was recorded at 25,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  with only 37.55% ( $\pm$  15.62) of that recorded for control haemocytes whereas at the highest dose the phagocytosis of haemocytes reached 65.38% ( $\pm$  37.55) of control. Exposure to POEAs led to

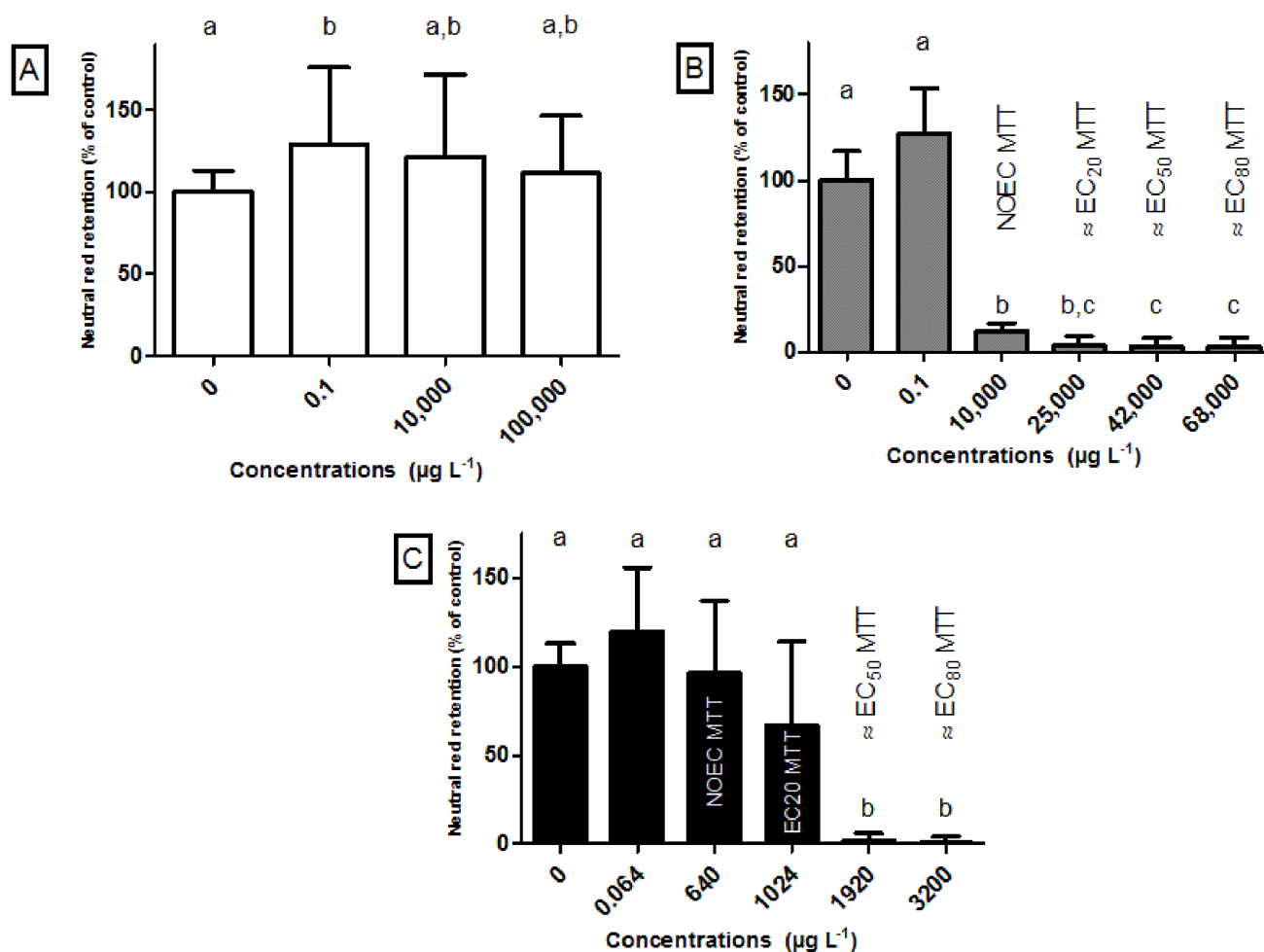


FIGURE 2.2 – Neutral red retention  $\pm$  standard deviation (in % of values recorded for control group) after 72h exposure to glyphosate (A) Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) (B) and POEAs (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different.

a significant decrease of haemocytes phagocytosis (SNK  $p < 0.05$ ) at the concentrations of 1024 ( $\times 0.60$ ) (EC<sub>20</sub> MTT), 1920 ( $\times 0.61$ ) and 3200  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $\times 0.53$ ) (Figure 2.3 C).

## 2.4 Discussion

Viability tests using mitochondria activity (such as MTT assay) are sensitive endpoints that have been previously used to assess the toxicity of different chemical compounds in molluscs. Domart-Coulon *et al.* (2000) have shown the toxicity of Mexel-432® (anti-fouling compound) on the hearth cells of *Crassostrea gigas* and gill cells from the clam *Ruditapes decussatus*. In *Haliotis tuberculata* haemocytes, the available literature have reported the ability of viability tests using mitochondria activities to assess the effect of zinc (Mottin *et al.*, 2010), cadmium (Latire *et al.*, 2012) or triclosan (Gaume *et al.*, 2012). In this study, exposure to the active matter alone did not lead to any significant

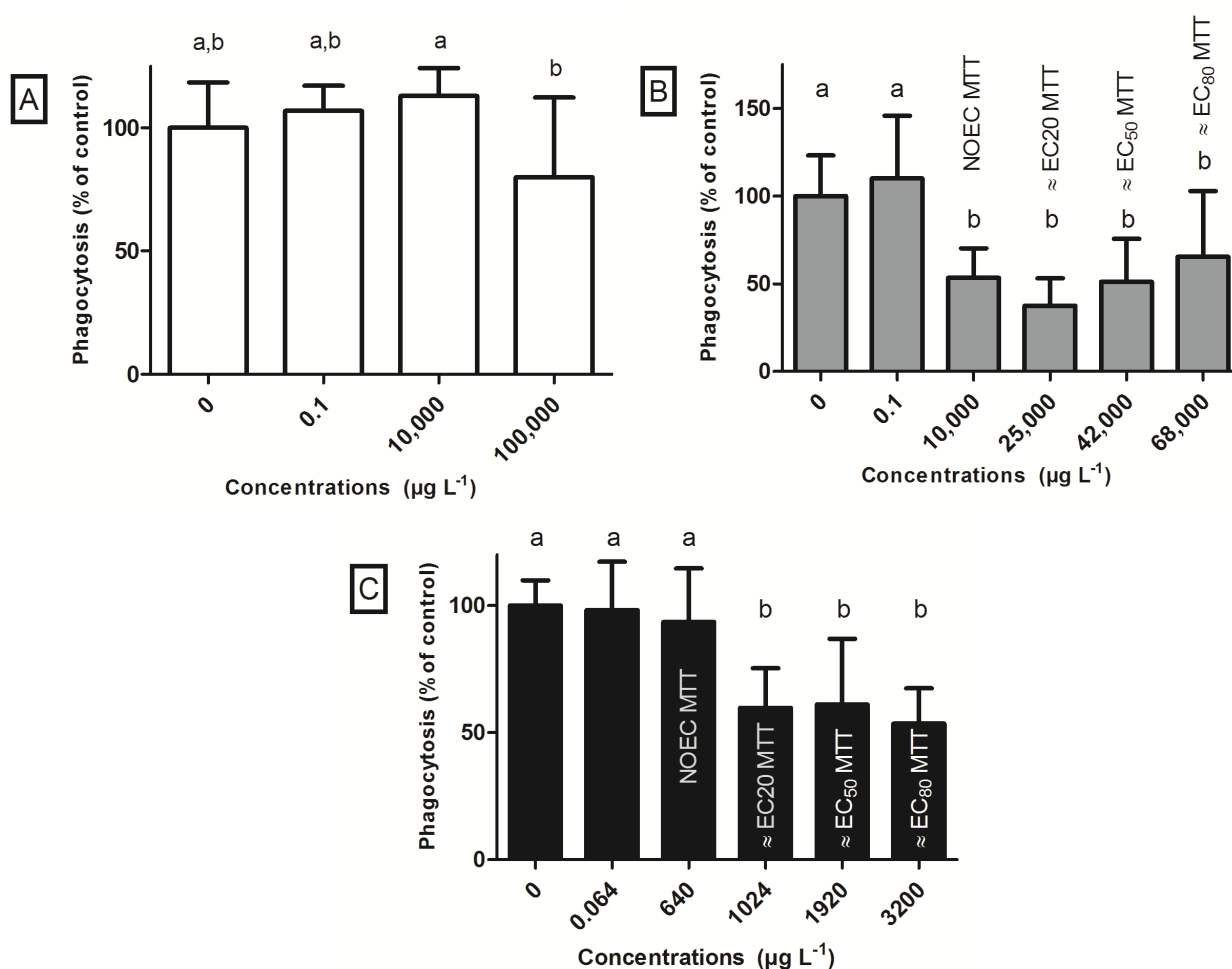


FIGURE 2.3 – Phagocytic activity expressed in % of haemocytes that had phagocytosed 3 beads or more  $\pm$  standard deviation (in % of values recorded for control group) after 72h exposure to glyphosate (A) Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) (B) and POEAs (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different.

decrease of viability even at very high doses while in the same range of concentrations, exposure to R<sub>EX</sub> led to significant losses of viability with an EC<sub>50</sub> 41.42 mg L<sup>-1</sup>. Furthermore the exposures to POEAs revealed much more toxic to abalone haemocytes than glyphosate or R<sub>EX</sub> with EC<sub>50</sub> as low as 1.86 mg L<sup>-1</sup>. As no data are available on the cytotoxicity of the studied compounds on *in vitro* mollusc cell cultures, we compared our results with *in vitro* exposure of human cell lines (Mesnage *et al.*, 2012). These authors tested the succinate dehydrogenase activity (MTT assay) of hepatic (HepG2), embryonic (HEK293) and placental (JEG3) cell lines after 24h exposure to glyphosate, different commercial glyphosate based formulations and adjuvants. Mesnage and his collaborators (2012) have demonstrated the very low toxicity of glyphosate which was non-toxic on Hep G2 cells and they computed EC<sub>50</sub> values reaching 19,300 and 11,192 mg L<sup>-1</sup> on HEK293 and JEG3 cell lines, respectively. Regarding to these results, it ap-

peared that the toxic concentration of glyphosate was 100 times much higher than the maximum one tested in the present study ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Exposure of haemocytes to REX and POEAs led to the same patterns than those observed by Mesnage *et al.* (2012) : glyphosate-based commercial formulations expressed a higher toxicity than glyphosate and adjuvants were the most toxic compounds on haemocytes. Furthermore, the  $\text{EC}_{50}$  values for abalone haemocytes were comparable with the  $\text{EC}_{50}$  values observed for JEG3 cell line. The Roundup Grands Travaux<sup>®</sup> led to an  $\text{EC}_{50}$  of  $32 \text{ mg L}^{-1}$  ( $41.42 \text{ mg L}^{-1}$  for abalone haemocytes exposed to  $\text{R}_{\text{EX}}$ ) whereas the POE-15 (one of the ethoxylated amine in adjuvant formulations) induced 50% of cell mortality at the concentration of  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1.86 \text{ mg L}^{-1}$  for abalone haemocytes exposed to POEAs).

The neutral red retention (NRR) is considered as a sensitive biomarker of *in vivo* exposure to chemicals and contaminated areas and it has been used in various mollusc species (Castro *et al.*, 2004; Dailianis *et al.*, 2003; Domouhtsidou *et al.*, 2004; Lowe *et al.*, 1995; Ringwood *et al.*, 1998). Although the glyphosate did not affect cell mortality whatever the tested concentrations, this molecule seemed to stimulate the lysosomal system at low doses. This type of results has been previously observed by Canty *et al.* (2007) who have reported a significant increase of NRR after 1h and 24h in haemocytes of mussels (*Mytilus edulis*) exposed *in vivo* to the organophosphate pesticide azame-thiphos. These authors suggested an upregulation of the lysosomal system probably involving an inhibition of signal transduction pathways that modulate activation and proliferation functions, or an action on the membrane protein pumps that regulate cellular ionic gradients ; however no mechanisms have been clearly established. Alternatively, the increase of NRR could be considered as an increase of the number of lysosomes in the exposed haemocytes. This mechanism has been previously described by Bado-Nilles *et al.* (2008) in *C. gigas* haemocytes exposed *in vitro* to dibenzo-[a,h]-anthracene and by Braunbeck and Appelbaum (1999) in *Cyprinus carpio* intestinal epithelium exposed *in vivo* to ultra-low doses of the insecticide endosulfan. These authors highlighted that lysosome proliferation could be considered has an unspecific sign of stress after exposure to a contaminant. The  $\text{R}_{\text{EX}}$  and POEAs exposures did not lead to significant a increase of NRR even if some trends could be observed at the lowest dose of contaminants. At contrary, these two chemicals compounds led to a drastic decrease of the NRR. It is interesting to note that this decrease appeared at  $\text{R}_{\text{EX}}$  concentrations which did not affect the succinate dehydrogenase activities (MTT assay) (i.e.  $10,000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). Moreover, at the concentration of POEAs that inhibited 50% of succinate dehydro-

genase activity, the NRR was near zero. This biomarker seemed thus to be relatively sensitive to chemical exposure in abalone haemocytes. In *Haliotis rubra* exposed *in vivo* to air, Song *et al.* (2007a) have observed the early response of lysosomal system of haemocytes before any mortalities of exposed abalone.

After glyphosate exposure, a slight decrease of phagocytosis occurred at the concentration of 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  while no decreases of haemocyte viability were observed at this concentration. Similarly, inhibition of phagocytic activities was recorded during REX exposure from a concentration that did not led to inhibition of mitochondrial succinyl deshydrogenase (i.e. 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). This type of results was also observed by Bado-Nilles *et al.* (2008) who have shown the inhibition of phagocytosis in *C. gigas* exposed *in vitro* to pyrene and fluorene without any decrease of cell viability. Likewise, Luna-Acosta *et al.* (2012) observed a huge phagocytosis inhibition in *C. gigas* haemocytes after *in vivo* exposure of spat to a mixture of pesticides and pharmaceuticals (5  $\mu\text{g L}^{-1}$  diuron, 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  isoproturon and 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  ibuprofen) but no decrease in cell viability was recorded. Sauvé *et al.* (2002) studied the phagocytic activities of marine and freshwater bivalves after *in vitro* exposures to various metals and concluded that the measurement of phagocytosis is a sensitive endpoint to assess the effects of pollutant at sublethal concentrations. Furthermore, Sauvé *et al.* (2002) have found that the concentrations of metals required to obtain 50% of suppression of phagocytic activities after *in vivo* exposure were different by several order of magnitude compared to those computed with *in vitro* exposure. However, ratio of *in vivo/in vitro*  $\text{EC}_{50\text{s}}$  were almost identical for all the tested contaminant suggesting that *in vitro* exposure model are representative of *in vivo* exposure. In *H. tuberculata* haemocytes, the studies conducted by Mottin *et al.* (2010) and Latire *et al.* (2012) have also shown the great sensitivity of phagocytosis after exposures to metals. Our results on phagocytosis and those reported by the different authors highlighted the interest of studying biomarkers such as phagocytosis which could reveal early effects on cells before any loss of viability.

As the data about *in vitro* effects of the glyphosate-based herbicides and adjuvants on abalone haemocytes are very scarce, we compared our results with *in vivo* results reported in different species. The adverse effects of the three chemical compounds tested in the present study were observed at non-realistic environmental concentrations. However, the results provided by the three endpoints used allowed us to classify the toxicity of the chemicals as follows : glyphosate < REX < POEAs and other studies have already reported this ranking. Indeed, a work on oyster larvae (*C. gigas*) has demons-

trated that the toxicity of  $R_{EX}$  on embryo-larval development was about 23-fold higher (i.e.  $EC_{50}$  of  $1.17 \text{ mg L}^{-1}$ ) than the toxicity induced by glyphosate (i.e.  $EC_{50}$  of  $27.18 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Mottier *et al.*, 2013). Furthermore, while no effects of glyphosate were observed on metamorphosis processes after 24h exposure,  $EC_{50}$  computed for  $R_{EX}$  reached  $6.94 \text{ mg L}^{-1}$ . The study performed by Howe *et al.* (2004) revealed that glyphosate did not cause any mortality on amphibians whereas Roundup® formulations containing POEAs and POEAs alone showed a similar toxicity profile. These authors concluded that POEAs surfactant contribute most of the acute toxicity of Roundup® formulations. Studying various species (i.e. marine bacterium, 2 species of microalgae, ciliate and planktonic crustacean species), Tsui and Chu (2003) have reported that POEA accounted for more than 86% of the Roundup® toxicity. Mechanisms of POEAs toxicity remain not fully known, but several authors have suggested that non-ionic surfactants could interact with lipid bilayer membrane and membrane proteins altering the membrane fluidity and oxygen transport across the membrane (Cserháti, 1995; Lindgren *et al.*, 1996; Pärt *et al.*, 1985). Our results are in accordance with the previous conclusions since the effects of Roundup® and POEAs were related to lysosomal membrane stability (NRRA) and cell lipid bilayer membrane (phagocytosis).

## 2.5 Conclusion

This study gave the first results on the effects of glyphosate-based herbicides in *H. tuberculta* haemocytes and provided important information to compare the toxicity of an active matter with one of its commercial formulations and its associated adjuvant. While no effect on cell viability appeared with all the tested concentrations of glyphosate or concentrations below  $20 \text{ mg L}^{-1}$  of  $R_{EX}$ , effects on cell membranes have been demonstrated at sub-lethal concentrations showing the utility of multi-biomarker approaches. The adjuvant seemed to be mainly responsible for the toxicity of commercial formulated glyphosate on non-target organisms. However, the toxicity of the tested molecules appeared at higher level of magnitude of concentrations than those observed in the environment.

## Acknowledgements

This study was supported by the European Program Interreg IVA "Chronexpo" coordinated by Dr. Bruno Fievet from IRSN (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire) of Cherbourg-Octeville and by the Region Basse-Normandie. The authors

thank Maryline Guillamin (IFR 146 ICORE) for her help in flow cytometry and the technical staff of the C.R.E.C. for their assistance in animal care.

## RAPPEL DES RESULTATS IMPORTANTS-CONCLUSION

- Le glyphosate seul ne provoque pas de baisse de la viabilité des hémocytes d'ormeaux pour toutes les concentrations testées ce qui suggère un faible potentiel toxique de cette molécule à court terme.
- Selon la classification adoptée par l'Agence de Protection de l'Environnement américaine (EPA), le glyphosate seul est "pratiquement non toxique" tandis que le glyphosate formulé et les adjuvants peuvent être qualifiés, respectivement, de "légèrement" et "modérément" toxique pour la viabilité des hémocytes d'*H. tuberculata*.
- Au niveau lysosomal, une stimulation pouvant être interprétée comme un stress cellulaire est enregistrée à la concentration environnementale de glyphosate tandis qu'une destabilisation des lysosomes est notée pour le R<sub>EX</sub> à des concentration n'induisant pas de baisse de viabilité.
- La phagocytose des hémocytes est inhibée en présence de la formulation commerciale et d'adjuvants.
- La toxicité des formulations commerciales à base de glyphosate semble principalement provenir des adjuvants qui agiraient au niveau des membranes biologiques.



## **Troisième partie**

### **Approche *in vivo* : tests embryo-larvaires**



Différentes matières actives herbicides et composés apparentés (formulations commerciales, adjuvant seul et produits de dégradation) ont été étudiés dans cette partie divisée en trois chapitres en fonction des molécules testées :

- **Chapitre 3** → Glyphosate, AMPA, Roundup Express<sup>®</sup>, Roundup allées et terrasses<sup>®</sup>
- **Chapitre 4** → Genamin T-200<sup>®</sup> (Polyethoxylated tallow amines : POEAs)
- **Chapitre 5** → Mecoprop, mecoprop-p, 2-methyl-4-chlorophenol

## OBJECTIFS

1. Évaluer la toxicité de molécules herbicides sur des organismes non cibles.
2. Comparer la toxicité de matières actives, de formulations commerciales et d'adjuvants.
3. Comparer la sensibilité de deux stades larvaires de *C. gigas*.
4. Apporter des éléments de réponse sur les modes d'action des différentes molécules testées.

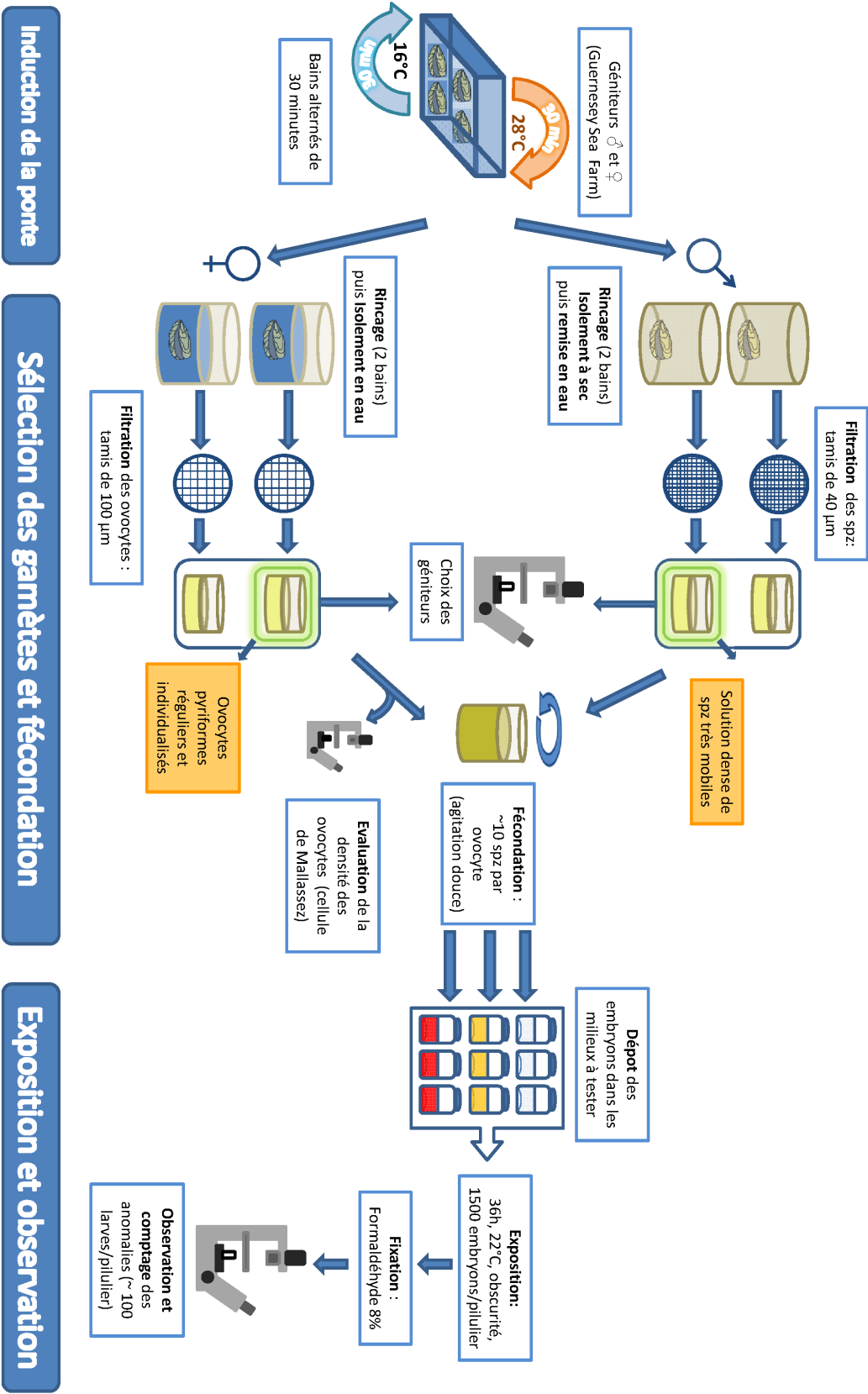


FIGURE 2.4 – Schéma récapitulatif de la méthode utilisée pour la réalisation du test d'embryotoxicité .

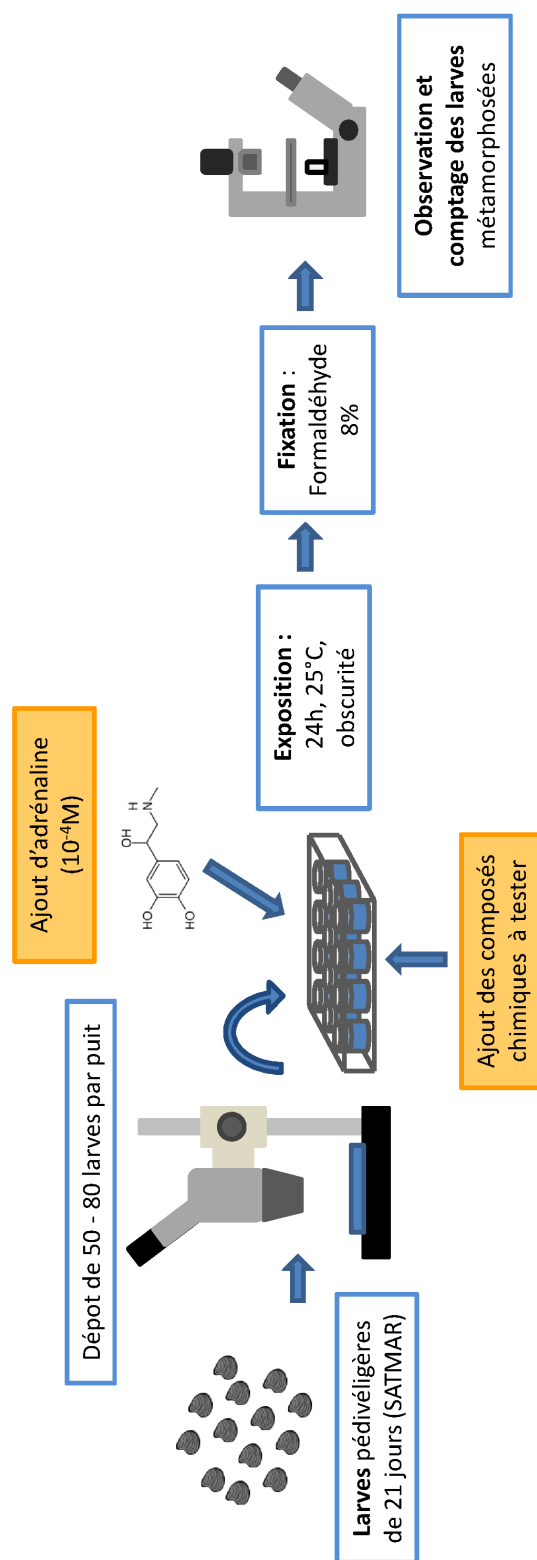


FIGURE 2.5 – Schéma récapitulatif de la méthode utilisée pour l'évaluation du test de la métamorphose.



## Chapitre 3

# Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

Antoine Mottier, Valérie Kientz-Bouchart, Antoine Serpentine, Jean Marc Lebel, Awadhesh N. Jha, Katherine Costil

*Aquatic Toxicology* 128-129 (2013) 67-78

### Abstract

Pesticides may be involved in oyster summer mortality events, not necessarily as a single causative agent but as an additional stressor. In this context, the present study aimed to assess the toxicity of glyphosate, its by-product, aminomethylphosphonic acid (AMPA) and two commercial formulations, Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) and Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>), containing glyphosate as the active ingredient, on the early life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The embryotoxicity of these chemicals were quantified by considering both the rates of abnormalities and the arrested development or types of abnormalities in D-shaped larvae after 48 h exposure. The success of metamorphosis was examined in pediveliger larvae exposed for 24 h. Experiments involving both endpoints included range finding experiments for herbicide concentrations ranging from 0.1 µg L<sup>-1</sup> to 100,000 µg L<sup>-1</sup>. This range was then narrowed down in order to determine precise EC<sub>50</sub> values. Actual concentrations of

the herbicide were determined at the beginning and after 48 h (embryotoxicity) and 24 h (metamorphosis) to evaluate the potential temporal variation in the concentrations. During embryo-larval development, no mortalities were recorded at any of the concentrations of glyphosate and AMPA, whereas no embryos or D-shaped larvae could be observed after exposure to 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of  $R_{\text{EX}}$  or  $R_{\text{AT}}$ . Compared with the controls, no effects on embryo-larval development were recorded between 0.1 and 1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , regardless of the chemical tested. Above a threshold, which varied according to the chemical used, the gradient of herbicide concentrations correlated with a gradient of severity of abnormality ranging from normal larvae to arrested development (an "old embryo" stage). The  $\text{EC}_{50}$  values were 28,315 and 40,617  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate and its metabolite respectively but a much lowered values of 1,133 and 1,675  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $R_{\text{EX}}$  and  $R_{\text{AT}}$ , respectively. Metamorphosis tests also revealed a significant difference between molecules, as the  $\text{EC}_{50}$  values exceeded 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate and AMPA but were as low as 6,366 and 6,060  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the commercial formulations, which appeared relatively more toxic. Overall, the embryo-larval development of *C. gigas* was more sensitive to glyphosate-based herbicides compared to various endpoints studied in regulatory model organisms, and embryos and D-shaped larvae were more sensitive compared to pediveliger larvae.

### 3.1 Introduction

In Europe, aquatic environments are continuously subjected to various contaminants originating from domestic, industrial and agricultural activities. The English Channel is especially affected by chronic contamination resulting from heavy shipping traffic, industrialisation (including nuclear industry) and high population density along the coastlines. For example, in the early 1980s, the Seine River, which flows into the English Channel, was considered one of the most contaminated rivers in the world (Carpentier *et al.*, 2002). Today, the situation in the Seine Estuary and the Channel remains worrying with respect to their ecological status and the quality of their marine resources (Cachot *et al.*, 2006; Schnitzler *et al.*, 2011). In addition to recent European legislations, which aim to maintain the high ecological status of the hydrosphere, such considerations have led to the launch of a European Interreg IVA program named "Chronexpo". Under this initiative, the "Chronexpo" project aims to study the effects of chronic exposure to various contaminants on ecologically and economically important marine organisms inhabiting the English Channel (e.g. annelids and molluscs).



The Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), was introduced into France in 1967 and now represents an important commercial bivalve species. With annual production varying from 126,000 to 138,000 tons during 1996-2006, France ranked top in Europe (and fourth in the world) for oyster production (CNC, 2010). Despite the effects of a current viral infection, France remains a leader in oyster farming producing 82,800 tons in 2010 (CNC, 2010). In Normandy and north Brittany, oysters are farmed in the sandy intertidal zones of the Channel, and this production represented, on average 20% and 24% respectively of total French production in 2009 (CNC, 2010). Nevertheless, in addition to spat mortalities due to epizootics involving viruses and bacteria, French oyster basins can sporadically experience significant mortality events (> 30%) in summer which threaten commercial production (Royer *et al.*, 2007; Soletchnik *et al.*, 2007). The summer mortality syndrome does not appear to result from a single cause but may result from a combination of several extrinsic and intrinsic factors including elevated temperature, low dissolved oxygen (hypoxia), xenobiotics and physiological stresses related to reproduction (Samain *et al.*, 2007). Climatic and hydrological surveys have shown that oyster mortalities occur when the water temperature exceeds 19°C. In Normandy, these mortalities have been especially high during years of high rainfall and in areas under estuarine influences (compared to zones exclusively under marine influence) (Costil *et al.*, 2005; Ropert *et al.*, 2008). In this context, terrestrial inputs including pesticides may be involved in oyster mortality events, not as a single causative agent, but as additional stressors.

Ecotoxicological studies involving marine organisms often address contaminants such as metals, polychlorobiphenyls (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and, less frequently, pesticides. Moreover, most of the studies concerning pesticides have focused on the particularly toxic organophosphate and organochlorine insecticides (e.g., Scott *et al.*, 2002; De Mora *et al.*, 2005). Many of these compounds are banned in France, which was the primary European country for pesticide use (62,700 tons of active substances used in 2011) (UIPP, 2012). Among pesticides, glyphosate-based herbicides are the most widely used in France and across the world (Baylis, 2000; Woodburn, 2000). In Normandy, more than 1,000 tons of these active substances were sold in 2009 (Agence de l'Eau Seine Normandie, *pers. com.*). Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine;  $C_3H_8NO_5P$ ] is a broad-spectrum aminophosphonate-type herbicide used in agricultural and non-agricultural activities; it inhibits plant growth by interfering with 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), which is a key enzyme for the production of essential aromatic amino acids (Amrhein *et al.*, 1980). Humans and ani-

mals cannot be considered as target organisms because they do not have this biosynthetic pathway. Since its first commercialisation in 1974, glyphosate has often been considered relatively non-toxic for humans and fauna (Williams *et al.*, 2000; Giesy *et al.*, 2000). It has also been regarded as an environmentally friendly pesticide because of its rapid biodegradation and strong adsorption to soil particles ( $K_{oc}=884$  to  $60,000 \text{ L kg}^{-1}$  depending on soil types) (??). However, glyphosate is highly water-soluble ( $10$  to  $15.7 \text{ g L}^{-1}$ ; Battaglin *et al.*, 2005) and is present in surface waters worldwide. In Europe, this herbicide and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) are thus frequently detected in aquatic ecosystems, sometimes at high concentrations (Botta *et al.*, 2009; SOS (Service de l'Observation et des Statistiques), 2010; Puértolas *et al.*, 2010).

In France, coastal environments are far less monitored in comparison to freshwater ecosystems, and little data exist describing contamination of marine or coastal waters by herbicides. In Normandy, 6 of the 15 herbicides under study (excluding glyphosate) were detected at low tide in seawater; the highest concentration was recorded for diuron ( $0.132 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Buisson *et al.*, 2008). In the bay of Arcachon (South West France), 5 herbicides were detected in seawater following tests for a total of 6 herbicides, and the maximum concentration was measured for irgarol ( $0.066 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Auby *et al.*, 2007). Because of analytical difficulties, the glyphosate/AMPA compounds remain particularly poorly documented in coastal environments (Munaron, 2004). Burgeot and his collaborators Burgeot *et al.* (2008) have reported maximum concentrations of glyphosate reaching  $0.10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and  $1.20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  in spring of 2003 and 2004, respectively, in the seawater of the basin of Marennes-Oléron (South West France). In the past, studies of the impacts of pesticides on organisms focused on active substances, whereas few studies have addressed commercial formulations. In the case of glyphosate, many commercial formulations are used in domestic and agricultural weed control. The brand Roundup® contains glyphosate formulated as an isopropylamine (IPA) salt, and a surfactant, polyoxyethylene tallow amine (POEA), is added to enhance the efficacy of the herbicide (Tsui and Chu, 2003). Tsui and Chu showed that Roundup® or the surfactant used are more toxic than glyphosate alone in bacteria (*Vibrio fischeri*) and in different aquatic plant and animal species. Such a result has also been demonstrated in freshwater oligochaetes (Contardo-Jara *et al.*, 2009), amphibians (Howe *et al.*, 2004, Hedberg and Wallin 2010) and mammals, including humans (Peixoto, 2005; Pieniążek *et al.*, 2004).

The sensitivity of organisms to contaminants depends on many factors, including the life cycle stages; early stages are often considered particularly sensitive (e.g., Giesy

and Graney, 1989; Jha *et al.*, 2000). In marine bivalves (oysters and mussels), often considered as sentinel organisms for coastal environments, embryo-larval stages are used in ecotoxicological studies. Some previous studies have examined larval growth or condition index ((Brereton *et al.*, 1973; Geffard *et al.*, 2007); the activities of different enzymes, including those implied in oxidative stress regulation (Damiens *et al.*, 2004; Quiniou *et al.*, 2007); and the integrity of DNA (Jha *et al.*, 2000; Hagger *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2006; Wessel *et al.*, 2007). Finally, many of the ecotoxicological studies using marine bivalve larvae have mainly evaluated the embryotoxic effects of various pollutants (Robert *et al.*, 1986; His *et al.*, 1999; Nice *et al.*, 2000; Lyons *et al.*, 2002; Libralato *et al.*, 2008; Cachot *et al.*, 2006; Akcha *et al.*, 2012). In this context, the study by Akcha *et al.* (2012) is especially interesting as it aimed to determine the potential embryotoxicity of two herbicides : diuron and glyphosate but the study tested a highest concentration of  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ . By comparison, the metamorphosis success of bivalve larvae has rarely been used as a biological response to study the impact of contaminants in the sensitive life stages (His *et al.*, 1997b). Studies of marine bivalve metamorphosis have especially addressed the impacts of hormones such as epinephrine (Coon and Bonar 1987, García-Lavandeira *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). It was therefore important to optimise the protocol suggested by Coon and Bonar (1987) to compare the results with those obtained on embryotoxicity evaluation. The aim of the present study was to assess the impacts of glyphosate, AMPA and two commercial formulations (Roundup Express® and Roundup Allées et Terrasses®) on the embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, by considering abnormality rates and the types of abnormalities. The second objective was to study the effects of the 4 substances on the success of metamorphosis of pediveliger larvae. The hypothesis of a higher toxicity of commercial formulations based on available literature was thus tested by observing two larval stages. In both cases, broad ranges of concentrations ( $0.1$  to  $100,000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were first tested because of a lack of data in the literature, and then, narrower ranges were used to more precisely determine the effective concentration that induces an effect on 50% of the population ( $\text{EC}_{50}$ ). Finally, the present study aimed to assess the usefulness of embryo-larval development and metamorphosis as toxicity endpoints in marine ecotoxicology, and to contribute to the assessment of glyphosate-based herbicide toxicity. Such an evaluation is particularly useful because glyphosate and AMPA are listed among “the substances subject to review for possible identification as priority substances or priority hazardous substances” (Official Journal of the European Union, 2008).

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Chemical compounds

Glyphosate, the active ingredient in commercial Roundup® herbicides, is highly water soluble (Battaglin *et al.*, 2005). It is considered a non-persistent molecule in soils (half-life, DT50 = 12 days) but relatively persistent in water considering its hydrolysis (> 30 days for pH ranging from 5 to 9) and photolysis times (69 and 77 days, respectively for pH of 7 and 9) (??). Glyphosate metabolises to AMPA which is highly water-soluble and persistent in soil (DT50 = 151 days). In this study, the effects of two commercial Roundup® herbicides were also assessed, Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) and Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>) (Monsanto Company, St-Louis, MO, USA), which contain 7.2 and 4.4 g L<sup>-1</sup> of glyphosate, respectively. In these formulations, adjuvants are used to aid or modify the action of the principal active ingredient (Tu *et al.*, 2001). In Roundup® formulations, the most widely used adjuvants are polyethoxylated tallowamines (POEA). In the present study, glyphosate (97% purity) and AMPA (97.5 % purity) were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH® (Augsburg, Germany). The two types of Roundup® were purchased from a garden centre. All concentrations given in this study are expressed in glyphosate equivalents. All of the solutions of herbicides used were prepared with natural sterilised open seawater (0.22 µm, Steritop® Millipore). For both endpoints, the nominal concentrations corresponding to 0.1, 1, 100 and 10,000 µg L<sup>-1</sup> of the chemicals (i.e. glyphosate and AMPA) were verified (in duplicate) by ultraperformance liquid chromatography (UPLC) and fluorometric detection (in accordance with NF ISO 21458) using UPLC Acquity with FLR detector (Waters) and a column Acquity BEH C18 -2.1x150 mm, 1.7 µm. Moreover, the analyses were performed at the beginning and at the end of the exposures to verify the variation in the tested concentrations during the period of the experiment. These analyses were performed once without embryos or larvae to avoid the interaction between the physico-chemical and biological processes. Finally, the concentrations of glyphosate and AMPA in both commercial formulations (R<sub>EX</sub> and R<sub>AT</sub>) were determined (5 replicates) to verify the values indicated on the labels by the Monsanto Company.

### 3.2.2 Embryotoxicity bioassay and experimental design

Embryo-larval toxicity tests were performed on oyster embryos exposed to herbicides using the standardised AFNOR procedure (AFNOR) published in 2009. Four experiments were conducted, and for each experiment, herbicide concentrations were

tested in triplicate. For the first two experiments, herbicide concentrations ranged from 0.1 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  with a factor of 10x between each two consecutive concentrations (7 concentrations in total + control). Then, embryos were exposed to additional concentrations of herbicides corresponding to narrower ranges to more precisely determine the  $\text{EC}_{50}$  values. For glyphosate and AMPA, the narrowed range was from 10,000 to 30,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and 9 and 11 different concentrations (+ control) were tested, respectively (Fig. 3.3A and 3.3B). For each commercial formulation, the narrowed range was between 1,000 and 2,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and a total of 18 different concentrations (+ control) were tested (Fig. 3.3C and 3.3D). Apart from the herbicide exposures and the control (0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Alfa Aesar GmbH®; Karlsruhe, Germany) was used as a positive control, with concentrations ranging from 20 to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (5 concentrations). Conditioned oysters were purchased from the Guernsey Sea Farm Ltd. hatchery (Guernsey, UK). Male and female gametes were obtained by thermal stimulation of 3 pairs of genitors (successive baths at 16°C or 28°C). After spawning, gametes from the different genitors were observed under a light microscope to select genitors with the best cell qualities : highly concentrated and motile spermatozoa and even, pear-shaped oocytes. The spermatozoa and oocytes of the selected parents were passed through, respectively, 40 and 100  $\mu\text{m}$  screens to remove debris. Female and male gametes (1 :6) were then mixed and gently agitated. The occurrence of fertilisation was verified with light microscope observations, and 20-min post-fertilisation, the embryos were distributed into glass pillboxes containing 25 mL of natural sterilised seawater (0.22  $\mu\text{m}$ , Steritop® Millipore). Embryos were exposed at a density of 60,000  $\text{L}^{-1}$  (corresponding to 1,500 embryos per pillbox) without feeding, aeration and light. After 48 h at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , embryos or D-shaped larvae were fixed using 0.5 mL of an 8% formalin solution. An average of 100 larvae was counted per replicate using an inverted binocular microscope at 400x magnification (Leica® DM IRB). Observations allowed the calculation of rates of abnormality and the discrimination among types of abnormalities ; 5 categories could be distinguished : shell and/or hinge abnormality, mantle abnormality (hypertrophies), shell and/or hinge + mantle abnormality, late arrested development and early arrested development (when cells could be distinguished and counted) (Fig. 3.1). The results of embryo-larval development in exposed organisms were expressed as net percentages of normal development,  $\text{NPN}_e$  (adjusted for the controls) as follows :

$$NPN_e = 100 - \left[ \frac{PA_e - \overline{PA_c}}{100 - \overline{PA_c}} \times 100 \right]$$

where :

$$PA_e = \frac{(NA_e \times 100)}{T_e}$$

$NA_e$  = Number of abnormal larvae in a given exposure replicate

$T_e$  = Total number of larvae in a given exposure replicate

$\overline{PA_c}$  = mean of  $PA_c$  (for a given experiment)

$$PA_c = \frac{(NA_c \times 100)}{T_c}$$

$NA_c$  = Number of abnormal larvae in a given control replicate

$T_c$  = Total number of larvae in a given control replicate

### 3.2.3 Metamorphosis bioassay and experimental design

The aim of this endpoint was to assess the metamorphosis rate of pediveliger larvae (ready for metamorphosis) exposed to herbicides. Experiments were performed 4 times, and each herbicide concentration was tested at least in triplicate. For the four experiments using glyphosate and AMPA, herbicide concentrations tested ranged from 0.1 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (broad range). For the Roundup<sup>®</sup> formulations, the two first experiments were conducted on the broad range of concentrations ; then, pediveliger larvae were exposed to a narrow range of concentrations between 1,000 and 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (19 concentrations + control) (Fig. 3.5B and 3.5C). Twenty-one-day-old pediveliger larvae were purchased from the SATMAR (Société ATLantique de MARiculture) hatchery (Barfleur, France). Larvae were exposed in multiwell plates (12-wells, NUNC<sup>®</sup>; Penfield, New York, USA) in a final volume of 1.5 mL of natural sterilised seawater

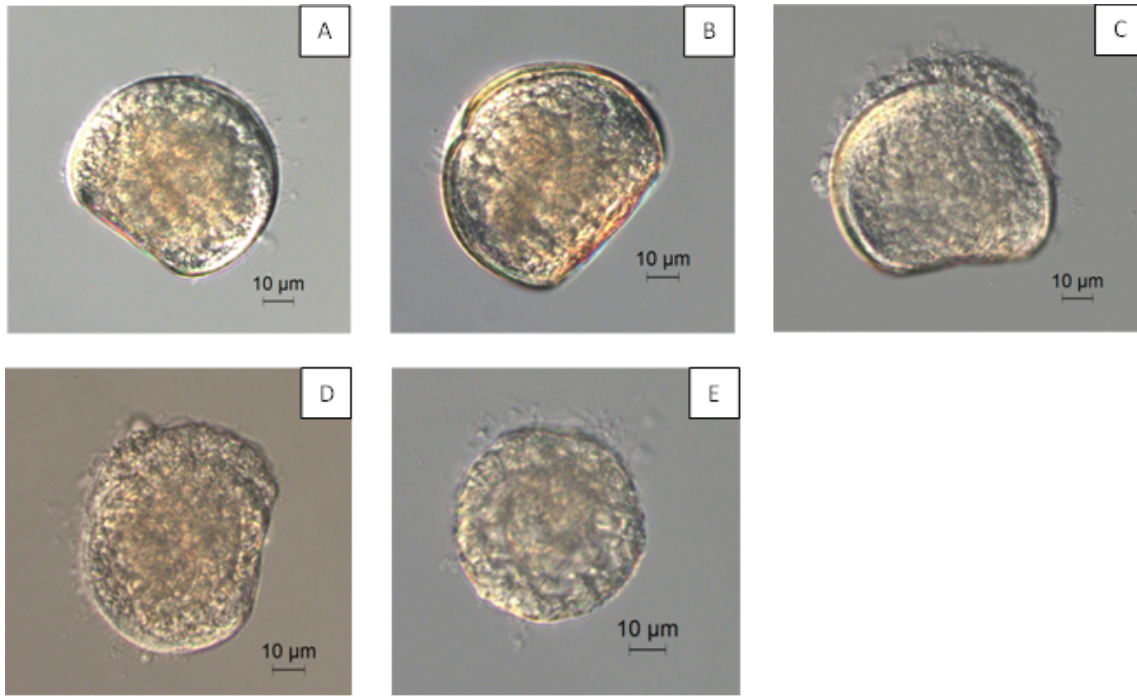


FIGURE 3.1 – Light microscopy images (x400) showing the morphology of the developmental stages of *Crassostrea gigas* at 48 h : (A) normal D-shaped veliger ; (B) D-shaped veliger showing abnormal shell ; (C) D-shaped veliger presenting hypertrophied mantle ; (D) D-shaped veliger exhibiting both shell/hinge and mantle abnormalities ; (E) embryo showing arrested development at the “old embryo” stage.

(0.22 µm, Steritop® Millipore). Larval density was set between 50 and 80 larvae per well. To promote metamorphosis, epinephrine (Sigma Aldrich®) was added at a final concentration of  $10^{-4}$  M (Coon and Bonar, 1987). Experiments were conducted for 24 h at 22°C without feeding, aeration and light. After 24 h, exposed larvae were observed using an inverted binocular microscope at 100x magnification (Leica® DM IRB) to count dead larvae that showed no movement and/or tissue degradations. Following this first count, larvae were fixed using an 8% formalin solution. The metamorphosis rate was evaluated by counting metamorphosed versus non-metamorphosed larvae. A larva was considered metamorphosed when it presented an obvious loss of its velum, new shell growth and well-developed gills (Fig. 3.2). Aside from metamorphosis processes, we also examined mortality, considering the latter “more serious” than a lack of metamorphosis. Metamorphosis rates were thus calculated by considering both the percentages of non-metamorphosed and dead larvae versus metamorphosed ones. The results of the metamorphosis test in exposed organisms were expressed as net percentages of metamorphosis,  $NPM_e$  (adjusted for the controls) as follows :

$$NPM_e = 100 - \left[ \frac{PNM_e - \overline{PNM_c}}{100 - \overline{PNM_c}} \times 100 \right]$$

where :

$$PNM_e = \frac{(NNM_e \times 100)}{T_e}$$

$NNM_e$  = Number of non metamorphosed larvae in a given exposure replicate

$T_e$  = Total number of larvae in a given exposure replicate

$\overline{PNM_c}$  = mean of  $PNM_c$  (for a given experiment)

$$PNM_c = \frac{(NNM_c \times 100)}{T_c}$$

$NNM_c$  = Number of non metamorphosed larvae in a given control replicate

$T_c$  = Total number of larvae in a given control replicate

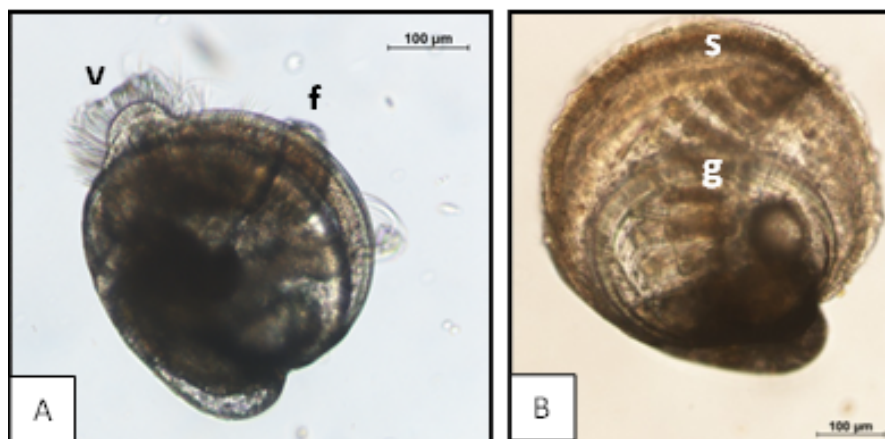


FIGURE 3.2 – (A) : A 21-day-old *C. gigas* pediveliger larva showing velum (v) and feet (f), versus (B) : a 20-day-old metamorphosed larva showing developed gills (g) and a shell growth (s).

### 3.2.4 Statistical analysis

The comparison of herbicide concentrations at the beginning of the experiments and after 24 h (metamorphosis test) or 48 h (embryotoxicity) exposure was performed using



Mann-Whitney tests. Non-linear regressions (using the Hill equation) on data obtained from the two endpoints allowed us to calculate various  $EC_X$  (effective concentration for an effect on X% of the individuals tested) values for each contaminant. These regressions were conducted using the Excel® macro REGTOX (Vindimian, 2012). Data related to the effects of glyphosate and AMPA on metamorphosis were statistically tested by one-way ANOVAs, as they met the assumptions of parametric tests (normal distribution and homogeneity of variances). On the other hand, the data on the impact of commercial formulations on metamorphosis and all of the data concerning embryotoxicity (even transformed) did not meet these assumptions ; thus, Kruskal-Wallis tests were employed to make conclusions about the significance of the differences between both the controls and the various herbicide concentrations and the herbicide concentrations themselves. When ANOVA or Kruskal-Wallis tests revealed significant differences, multiple comparison tests (Student Newman Keuls ; SNK or SNK modified for Kruskal-Wallis test) were then undertaken to distinguish among different groups (Scherrer, 1984). All of the analyses were conducted using STATISTICA 8.0 software (Statsoft®, Tulsa, OK, USA).

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Analyses of the tested molecules

For the glyphosate and AMPA exposures, the measured concentrations in general were slightly higher than the nominal concentrations (Table 3.1 ) ; these differences were greater for the lowest concentrations (1 and above all  $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and reached a maximum of % ( $0.14 \mu\text{g L}^{-1}$  instead of  $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) for the embryotoxicity test at T0h. However, the measured concentrations were globally close to the nominal concentrations. The glyphosate concentrations of Roundup Express® ( $R_{EX}$ ) and Roundup Al-lées et Terrasses® ( $R_{AT}$ ) averaged  $9.52 \text{ g L}^{-1}$  ( $\pm 1.23$ ) instead of  $7.20 \text{ g L}^{-1}$ , and  $6.27 \text{ g L}^{-1}$  ( $\pm 1.63$ ) instead of  $4.40 \text{ g L}^{-1}$ , respectively. It thus appeared that the commercial formulations were overdosed by +32.22% for  $R_{EX}$  and +42.50% for ( $R_{AT}$ ). For the exposures of embryos and larvae to Roundup®, the various solutions were prepared based on the advertised concentrations (i.e., 7.2 and  $4.4 \text{ g L}^{-1}$ ) ; therefore, the true concentrations exceeded the nominal ones for both endpoints (Table 3.1). The maximal difference attained was 50% for the embryotoxicity test with  $R_{EX}$  at T0h and T48h ( $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$  instead of  $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), but generally, the excess did not reach the proportion of 32.22% for

$R_{EX}$  and 42.50% for  $R_{AT}$ , especially for the highest concentration tested (10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). When the values recorded at the beginning of the experiments were compared with those measured after 24 or 48 h of exposure, no significant differences were calculated (Mann-Whitney tests,  $p>0.05$ ), and it could be concluded that the organisms were exposed to constant concentrations during the two types of experiments.

TABLE 3.1 – Results (mean values in  $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) of the herbicide analyses performed for both end-points at the beginning of the experiment and after 24 h or 48 h of exposure to glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA) and two commercial formulations : Roundup Express® and Roundup Allées et Terrasses®.

Nominal concentrations		Embryotoxicity		Metamorphosis rate	
		T0h	T48h	T0h	T24h
Glyphosate ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.1	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01
	1	1.20 $\pm$ 0.07	1.20 $\pm$ 0.08	1.09 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.05
	100	114.1 $\pm$ 3.1	114.5 $\pm$ 3.9	109.7 $\pm$ 7.1	113.0 $\pm$ 1.4
	10,000	10,025 $\pm$ 113	9833 $\pm$ 244	10,407 $\pm$ 166	11,055 $\pm$ 155
AMPA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.1	0.14 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.01
	1	1.09 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.01	1.04 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.00
	100	108.7 $\pm$ 2.8	103.4 $\pm$ 0.04	102.8 $\pm$ 0.1	104.1 $\pm$ 0.6
	10,000	10,625 $\pm$ 403	9957 $\pm$ 67	9805 $\pm$ 7	10,392 $\pm$ 39
$R_{EX}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.1	0.15 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02
	1	1.21 $\pm$ 0.01	1.29 $\pm$ 0.00	1.07 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.00
	100	108.7 $\pm$ 2.6	122.6 $\pm$ 15.9	119.6 $\pm$ 16.5	110.9 $\pm$ 0.2
	10,000	10,625 $\pm$ 403	10,745 $\pm$ 49	10,455 $\pm$ 14	10,757 $\pm$ 272
$R_{AT}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.1	0.13 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01
	1	1.25 $\pm$ 0.00	1.32 $\pm$ 0.01	1.25 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.03
	100	136.6 $\pm$ 4.8	135.6 $\pm$ 0.6	138.1 $\pm$ 12.7	116.3 $\pm$ 3.0
	10,000	10,652 $\pm$ 286	10,662 $\pm$ 11	12,140 $\pm$ 827	11,845 $\pm$ 537

### 3.3.2 Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development

For each experiment, the results of the embryo-larval bioassay revealed very high levels of fecundation, as almost no oocytes were recorded and the observed organisms were embryos and normal or abnormal D-larvae. Moreover, all of the embryotoxicity tests presented in this study could be validated because they respected the two validation conditions required by the standardised procedure (AFNOR, 2009) : in controls, the rate of normal larvae must reach at least 80%, and the  $EC_{50} \text{ Cu}^{2+}$  must fall between 6 and 16  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Indeed, these parameters ranged, respectively, from 82.94% (SEM :  $\pm 2.51\%$ ) to 92.08% (SEM :  $\pm 1.48\%$ ), and from 8.47 to 12.43  $\mu\text{g L}^{-1}$  in our experiments. Exposures to glyphosate (and AMPA) and to commercial formulations gave different results in terms of organism survival and embryo-larval development. No mortalities were observed at any of the concentrations of glyphosate and AMPA tested, even at 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; however, at this highest concentration, only embryos and abnormal

D-shaped larvae were present. In contrast, at 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of  $R_{\text{EX}}$  and  $R_{\text{AT}}$ , no embryos or D-larvae were observed, and mortality rates of 100% were thus recorded. In comparison to controls, no effects on embryo-larval development were recorded between 0.1 and 1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  regardless of the chemical studied (Fig. 3.3). A drastic impact of herbicide exposure was observed between 1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for both Roundup® formulations (Fig. 3.3C and 3.3D), whereas this hazardous effect occurred between 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate (Fig. 3.3A) and AMPA (Fig. 3.3B). From 20,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of glyphosate or AMPA, the rates of normal D-shaped larvae decreased, but compared to the lower concentrations, the differences were not significant (Kruskal-Wallis and SNK tests,  $p > 0.05$ ) due to a high degree of heterogeneity (Fig. 3.3A and 3.3B).

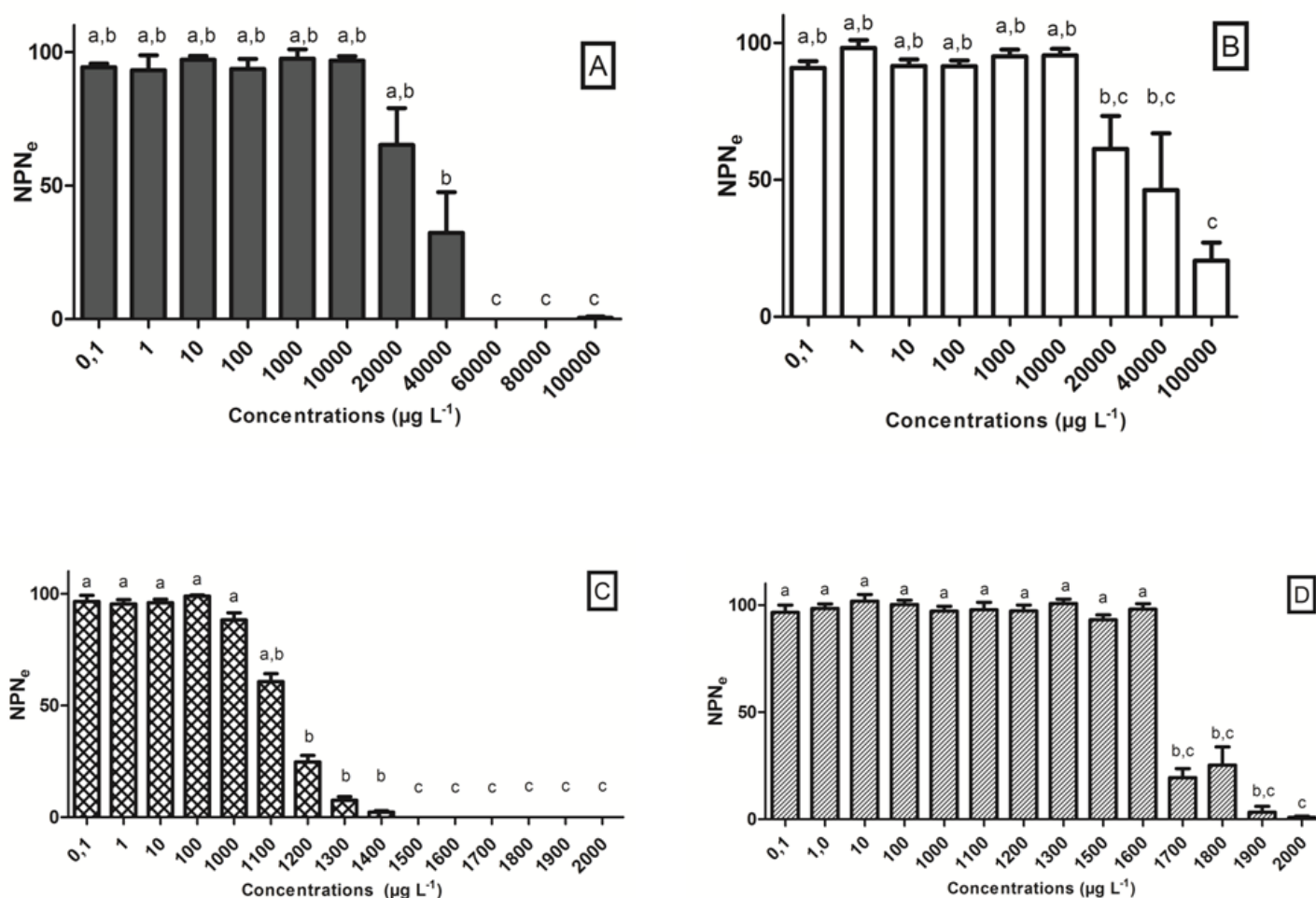


FIGURE 3.3 – Net percentages of normal development (NPN<sub>e</sub>) ( $\pm$  SEM) in *C. gigas* embryo-larvae observed after 48 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.10 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate (A) and AMPA (B) or 2,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Roundup Express® ( $R_{\text{EX}}$ ) (C) and Roundup Allées et Terrasses® ( $R_{\text{AT}}$ ) (D). Since no normal larvae were observed at the tested concentrations of 4,000, 6,000 and 8,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $R_{\text{EX}}$  and  $R_{\text{AT}}$ , they are therefore not represented. The concentrations that do not share a letter are significantly different; by convention, the controls belong to group a. For  $R_{\text{AT}}$ , NPN<sub>e</sub> data lacking at 1,400  $\mu\text{g L}^{-1}$  due to a technical problem.

Compared to glyphosate, AMPA showed a higher  $EC_{50}$  value :  $40,617 \mu\text{g L}^{-1}$  (versus  $28,315 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Table 3.2). Moreover, at the highest concentration ( $100,000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), glyphosate appeared to be slightly more toxic than AMPA because the net percentages of normal development ( $NPN_e$ ) were  $0.52\%$  ( $SEM : \pm 0.45\%$ ) and  $20.45\%$  ( $SEM : \pm 6.88\%$ ), respectively. For the exposures to commercial formulations, no normal larvae were observed at the tested concentrations of  $4,000$ ,  $6,000$  and  $8,000 \mu\text{g L}^{-1}$ . This conclusion led us to narrow the range of tested concentrations of  $R_{EX}$  and  $R_{AT}$  again, to between  $1,000$  and  $2,000 \mu\text{g L}^{-1}$ . From the exposure to  $1,000 \mu\text{g L}^{-1} R_{EX}$ ,  $NPN_e$  progressively decreased up to the concentration of  $1,500 \mu\text{g L}^{-1}$ , which did not allow normal larval development in *C. gigas* (Fig. 3.3C). For  $R_{AT}$  exposure, the  $NPN_e$  profile differed because no significant effects were observed up to  $1,600 \mu\text{g L}^{-1}$ , and a sharp decrease was then noted (Fig. 3.3D). Considering both the  $EC_{10}$  and  $EC_{50}$  values (Table 3.2), the tested commercial formulations were more toxic than the active matter and its metabolite, and among the Roundup® formulations,  $R_{EX}$  was the most toxic with an  $EC_{50}$  of  $1,133 \mu\text{g L}^{-1}$  (versus  $1,672 \mu\text{g L}^{-1}$  for  $R_{AT}$ ). When abnormal embryo-larval development was observed, different types of abnormalities could be distinguished (Fig. 3.4A to 3.4D). If we consider the controls and the range of herbicide concentrations where no effects were recorded regardless of the chemical used (i.e.,  $0.1$  to  $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), it appeared that the most frequent abnormalities ( $4.3$ - $6.3\%$ ) were arrested development at the “old embryo” stage (EMB) and abnormalities affecting the shell and/or hinge (SHEL). The percentages of abnormalities affecting the mantle (MANT) or both the shell and mantle (MASH) significantly increased from approximately  $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$  for the commercial formulations (Fig. 3.4C and 3.4D) and  $10,000 \mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate and AMPA (Fig. 3.4A and 3.4B). Exposures to  $R_{EX}$  could be distinguished by the frequency of these abnormalities. At the highest concentrations, frequent arrest of development at the “old embryo” stage was observed. The level of  $50\%$  “old embryos” was not attained for AMPA and occurred at  $40,000 \mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate,  $1,850 \mu\text{g L}^{-1}$  for  $R_{AT}$  and  $1,550 \mu\text{g L}^{-1}$  for  $R_{EX}$ .

### 3.3.3 Effects of glyphosate-based herbicides on larval metamorphosis

Aside from metamorphosis rates, mortality rates were also considered because mortality processes are « » more serious than a lack of metamorphosis. For the four metamorphosis tests performed, the mortality rate of the controls was  $1.73\%$  ( $SEM : \pm 0.47\%$ ). For the exposures to glyphosate and AMPA, mortality rates were low whatever the concentration tested ; they ranged, respectively, from  $1.68\%$  ( $SEM : \pm 0.71\%$ ;  $10$

TABLE 3.2 – Ecotoxicological parameters calculated for (1) the embryotoxicity tests (rates of mortality and abnormalities in D-shaped larvae) and (2) the rates of pediveliger larvae mortality and metamorphosis after 48 h exposures to 4 herbicide substances : glyphosate (GLY), AMPA, Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) and Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>). EC<sub>X</sub> = effective concentration (in µg L<sup>-1</sup>) which induces an effect on X% of the population (10 or 50%).

Endpoints	Parameters	GLY	AMPA	R <sub>EX</sub>	R <sub>AT</sub>
Abnormality rates in D-shaped larvae	EC <sub>10</sub>	13,457	10,299	1006	1628
	EC <sub>50</sub>	28,315	40,617	1133	1672
Mortality rates of pediveliger larvae	EC <sub>10</sub>	>100,000	>100,000	6601	4991
	EC <sub>50</sub>	>100,000	>100,000	8502	7934
Metamorphosis rates of pediveliger larvae	EC <sub>10</sub>	>100,000	>100,000	5215	4150
	EC <sub>50</sub>	>100,000	>100,000	6366	6060

µg L<sup>-1</sup> L-1) to 7.49% (SEM : ± 2.76% ; 100,000 µg L<sup>-1</sup>) and from 1.22% (SEM : ± 0.61% ; 10 µg L<sup>-1</sup>) to 2.84% (SEM : ± 1.03% ; 1,000 µg L<sup>-1</sup>). In both cases, the EC<sub>50</sub> value was higher than 100,000 µg L<sup>-1</sup> (Table 3.2). By contrast, the tests applied to the commercial formulations revealed far higher mortality rates ; EC<sub>50</sub> values were as low as 8,502 and 7,934 µg L<sup>-1</sup> for R<sub>EX</sub> and R<sub>AT</sub>, respectively. For the 4 experiments, the metamorphosis rate of the controls reached 78.03% (SEM : ± 1.50%). By comparison with mortality rates, the metamorphosis rates of pediveliger larvae showed similar differences between herbicide substances. Indeed, glyphosate and AMPA (Fig. 3.5A) appeared far less toxic than the two commercial formulations (Fig. 3.5B and 3.5C), and for the former substances, the wide range tested (up to 100,000 µg L<sup>-1</sup>) did not allow us to determine the EC<sub>50</sub> values (Table 3.2). Although no significant differences were found among the different concentrations of AMPA (ANOVA, p=0.08), the highest concentration of glyphosate induced a slight but significant decrease in the metamorphosis rate to 80.15% (SEM : ± 5.50%) (ANOVA, p<0.001 ; SNK, p<0.01). The exposures to R<sub>AT</sub> showed a significant decrease of the metamorphosis rate with increases in the R<sub>AT</sub> concentration above 4,000 µg L<sup>-1</sup> (Kruskal & Wallis, p<0.001) (Fig. 3.5C). Two rather low concentrations (1 and 10 µg L<sup>-1</sup>) led to slight decreases in the metamorphosis rate, which did not differ significantly from the rate recorded at 4,000-6,800 µg L<sup>-1</sup> (group b) ; however, for these two low concentrations, the standard errors were particularly high. The profile of metamorphosis rates recorded for R<sub>EX</sub> exposures (Fig. 3.5B) was similar to that of R<sub>AT</sub> exposures, and from 5,000 µg L<sup>-1</sup>, the metamorphosis rate significantly decreased with an increasing concentration of R<sub>EX</sub> (Kruskal & Wallis, p<0.001). Finally, for the two types of Roundup®, the EC<sub>50</sub> showed similar values : 6,366 µg L<sup>-1</sup> and 6,060 µg L<sup>-1</sup> for R<sub>EX</sub> and R<sub>AT</sub>, respectively (Table 3.2).

TABLE 3.3 – Ecotoxicological parameters corrected by considering the measured concentrations of herbicides (instead of the nominal concentrations ; for comparison, see Table (3.2) for the embryotoxicity tests and the rates of pediveliger larvae metamorphosis. GLY = glyphosate ; AMPA = glyphosate metabolite ; R<sub>EX</sub> = Roundup Express® and R<sub>AT</sub> = Roundup Allées et Terrasses®. EC<sub>X</sub> = effective concentration (in µg L<sup>-1</sup>) that induces an effect on X% of the population (10 or 50%).

Endpoints	Parameters	GLY	AMPA	R <sub>EX</sub>	R <sub>AT</sub>
Abnormality rats in D-shaped larvae	EC <sub>10</sub>	13,347	11,032	1037	1951
	EC <sub>50</sub>	27,175	46,105	1168	2001
Metamorphosis rates of pediveliger larvae	EC <sub>10</sub>	>100,000	>100,000	5778	5244
	EC <sub>50</sub>	>100,000	>100,000	6940	7550

### 3.4 Discussion

#### 3.4.1 Concentrations of chemicals and their dynamics

In the present study, glyphosate-based herbicides were examined because of their very important use in agricultural and non-agricultural activities throughout the world (Baylis, 2000; Woodburn, 2000). Before evaluating the potential effects of these herbicides on the Pacific oyster, it was important to assess the contaminant's fate and concentration dynamics in the glass pillboxes (embryotoxicity) and in the multiwell plates (metamorphosis) during experiments lasting 48 and 24 h, respectively. In the absence of larvae, analyses of glyphosate and AMPA showed no significant differences between the values measured at the beginning and the end of the experiments. This result suggested that no hydrolysis occurred in our experimental conditions ; photolysis could also be excluded because the embryos and larvae were incubated in total darkness. The materials used for the embryotoxicity (glass) and metamorphosis tests (polystyrene including the treatment Surface Nunclon<sup>tm</sup>) also allowed us to avoid a significant adsorption of tested chemicals onto the experimental surfaces. The embryos and larvae were thus exposed to constant herbicide concentrations. The herbicide analyses were also performed to compare the nominal concentrations with the true concentrations in our experimental conditions. At the beginning and end of the experiments, the measured concentrations were generally higher than the nominal ones, and the factor varied according to the concentrations (Table 3.1). For glyphosate and AMPA, the differences between the nominal and measured concentrations were most likely due to experimental handling and/or changes that occurred during the analyses. For the commercial formulations, the potential differences due to handling remains valid, but another source of difference can also be put forward. Indeed, the commercial formulations were overdosed : 6.27 g L<sup>-1</sup> (instead of 4.40 g L<sup>-1</sup>) for Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>) and 9.52 g L<sup>-1</sup> (instead of 7.20 g L<sup>-1</sup>) for Roundup Express® (R<sub>EX</sub>). Regarding the

differences between the nominal and measured concentrations, the values of  $EC_{50}$  for both endpoints were re-calculated by considering the measured concentrations (Table 3.3). For herbicide concentrations not analysed, theoretical measured concentrations were calculated from the concentrations analysed (i.e. 0.1 ; 1 ; 100 and 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) by fitting polynomial equations, the fitness of which was evaluated by the values of  $R^2$ . For the embryotoxicity tests, the corrected values of  $EC_{50}$  were higher : +3.15% for  $R_{EX}$ , +13.51% for AMPA and +19.67% for  $R_{AT}$ , except for glyphosate (-4.02%). For the metamorphosis tests, the corrected  $EC_{50}$  values were also higher, especially for  $R_{AT}$  (+24.59%) compared to  $R_{EX}$  (+9.00%) (Table 3.3). Nevertheless, the values of  $EC_{50}$  and corrected  $EC_{50}$  were close for each compound and both endpoints.

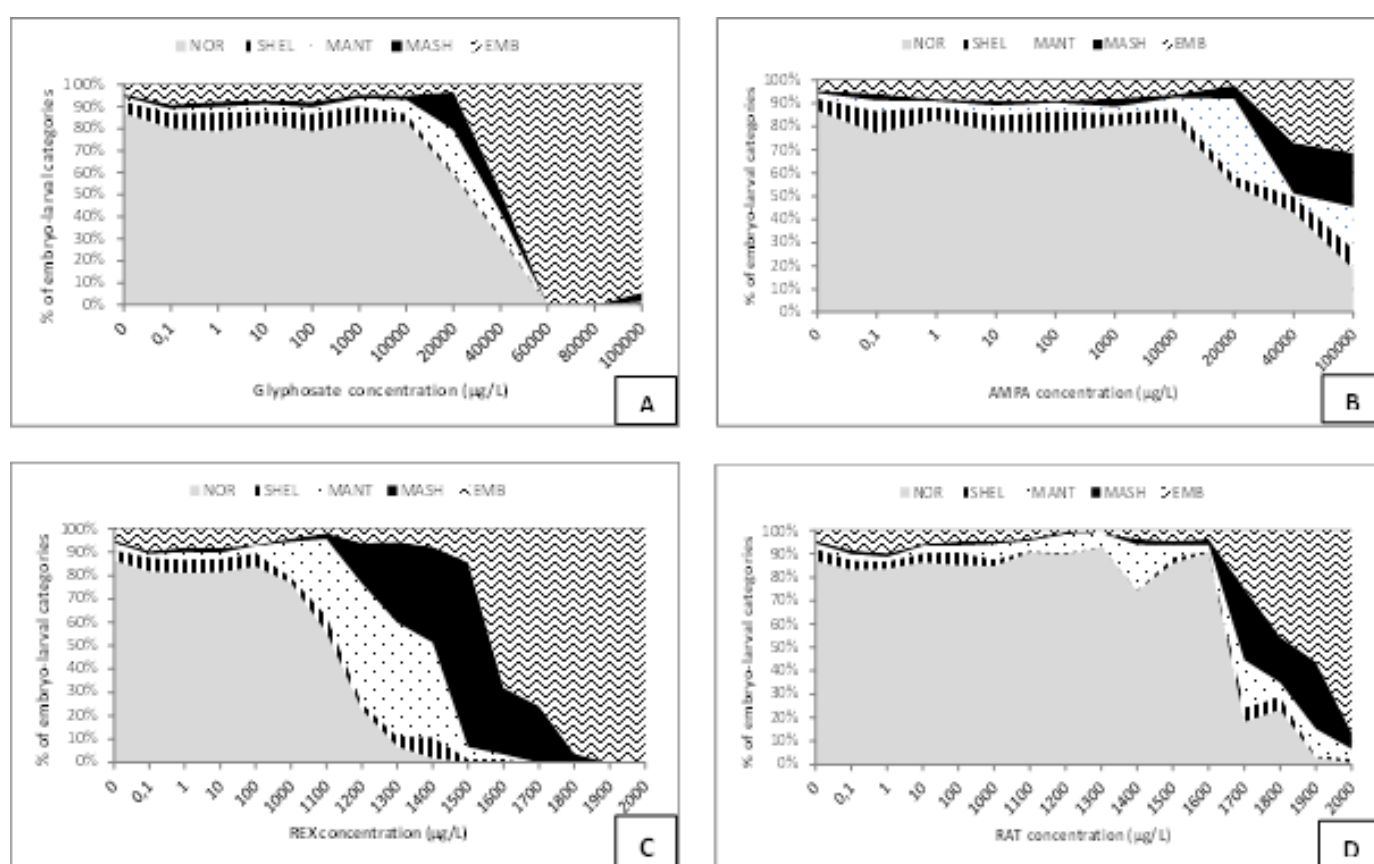


FIGURE 3.4 – The occurrence of the various types of abnormalities affecting embryo-larval development in *C. gigas* after 48 h of herbicide exposure in relation to the concentrations of 4 chemicals : (A) glyphosate ; (B) AMPA ; (C) Roundup Express® and (D) Roundup Allées et Terrasses®. NOR : normal D-shaped larvae ; SHEL : D-shaped larvae exhibiting shell and/or hinge abnormalities ; MANT : D-shaped larvae showing a hypertrophied mantle ; MASH : D-shaped larvae presenting an abnormality affecting both shell/hinge and mantle ; EMB : “old embryo”.

### 3.4.2 Effects of glyphosate-based herbicides on larval metamorphosis versus embryonic larval development

It has already been reported that early life stages of the organisms are especially sensitive to toxicological injury (e.g., Giesy and Graney, 1989 ; Jha *et al.*, 2000), and the present study suggested that among the youngest stages, the embryos and 48 h D-shaped larvae were more sensitive than 21 d larvae. The sensitivity of the very early stages can be linked with the very essential processes occurring in this period ; morphological axes are being formed, cells are being rearranged, their fate is specified, and multilayered axes are being formed (Gilbert, 2003). By comparison, some morphological and anatomical changes occur during metamorphosis, but they cannot be considered so important. In *Crassostrea gigas*, Baker and Mann (1994) distinguished 2 primary metamorphosis stages (prodissoconch post-larvae and dissoconch post-larvae), where the main changes are the progressive degeneration of the velum, the eyespots and then the foot ; the gradual development of the gills ; and the growth of the shell beyond the margin of the prodissoconch. These changes involve the histolysis of larval tissues, differentiation and proliferation of adult tissues along with associated biochemical and physiological modifications. The mechanisms that control these concomitant changes have been investigated by Coon and Bonar (1987) and García-Lavandeira *et al.* (2005). GABA and epinephrine induced both settlement and metamorphosis in 4 different marine bivalves, including the oyster *Ostrea edulis* (García-Lavandeira *et al.*, 2005). By studying metamorphosis in *C. gigas*, Coon and Bonar (1987) demonstrated for the first time the existence of  $\alpha 1$ -adrenoceptors in molluscs and suggested  $10^{-4}$  M epinephrine to promote metamorphosis. Compared to natural substrates or substrates used in hatcheries, multiwell plates did not offer an optimal surface for pediveliger larvae to metamorphose. We performed tests without adding epinephrine, but they did not allow metamorphosis to take its course, whereas tests conducted on the same batch of pediveliger larvae led to metamorphosis when epinephrine was added. The effect of herbicides on metamorphosis was assessed by comparing the rates of exposed larvae with those of controls, but an interaction between epinephrine and the tested herbicides cannot be excluded. To avoid the addition of epinephrine, it could be interesting in the future to elaborate a protocol that allows both the use of a more convenient substrate and the possibility of distinguishing metamorphosed larvae from non-metamorphosed individuals. Nevertheless, the metamorphosis test, which is quite inexpensive and easy to apply, provide interesting and ecologically relevant results, and



this test can be recommended for ecotoxicological evaluation of contaminants. Quite surprisingly, metamorphosis in bivalves has been rarely employed as an endpoint in ecotoxicology in comparison with the use of embryo-larval development. His et al. (1997b) studied the impact of sediment contaminated by PAHs on the metamorphosis of *C. gigas*. They concluded that unfiltered and filtered elutriates drastically reduced larval metamorphosis and showed a dose-response.

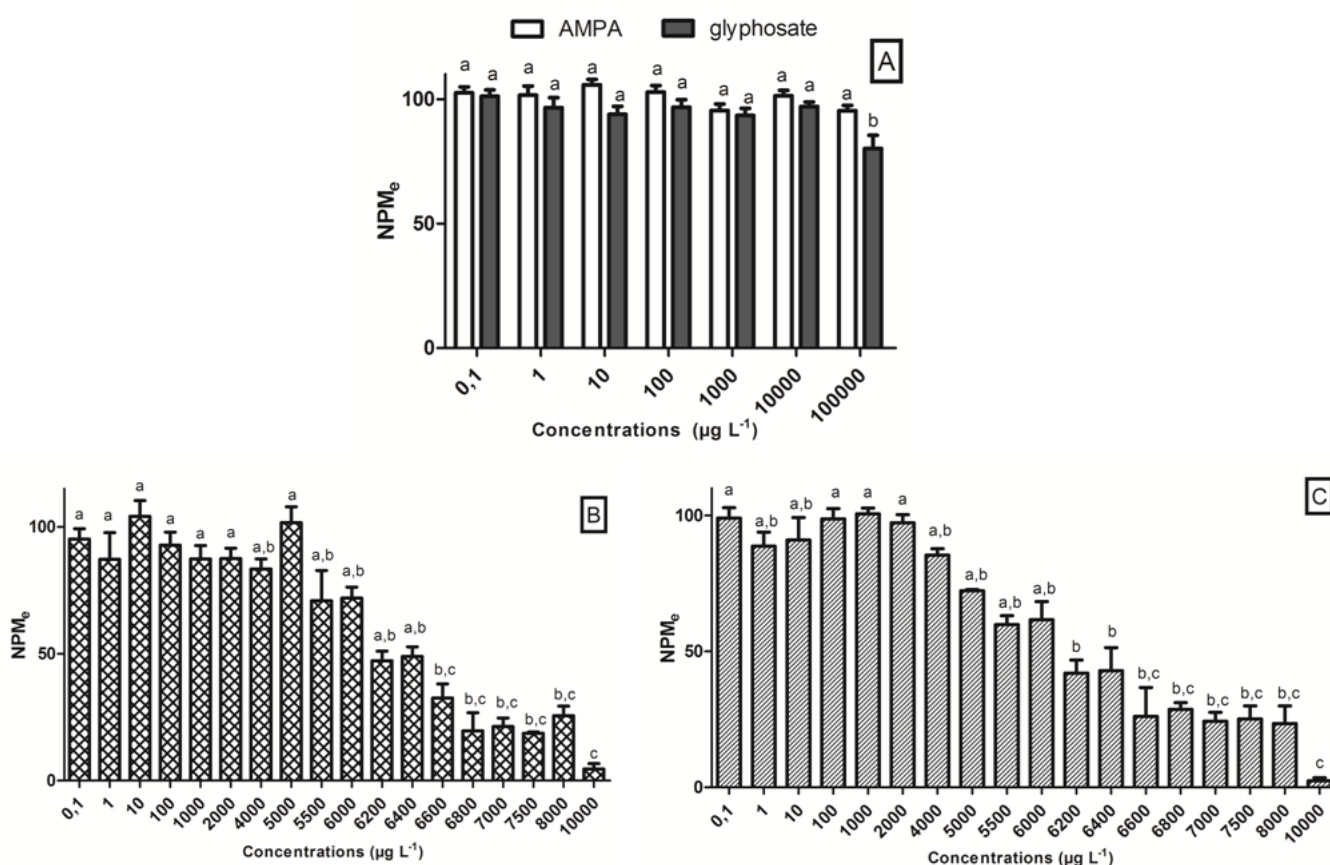


FIGURE 3.5 – Net percentages of metamorphosed larvae (NPM<sub>e</sub>) (± SEM) observed after 24 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.1 to 100,000 μg L<sup>-1</sup> for glyphosate and AMPA (A) or 10,000 μg L<sup>-1</sup> for Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) (B) and Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>) (C). Since no metamorphosis was observed at the tested concentration of 100,000 μg L<sup>-1</sup> for R<sub>EX</sub> and R<sub>AT</sub>, the data are therefore not presented. The concentrations that do not share a letter are significantly different; by convention, the controls belong to group a.

### 3.4.3 Effects of various contaminants on the embryo-larval development of marine bivalve species

The embryo-larval development of various invertebrates constitutes a useful microscopic endpoint in ecotoxicology. However, in most of the published literature dealing with embryotoxicity, the qualitative nature of abnormalities is not specified, and

the results are expressed only in terms of rates of abnormality. In the present study, distinctions between the different types of abnormalities were made, and shell abnormalities appeared to be less severe compared with arrested development (occurring earlier) or abnormalities affecting the mantle (Fig. 3.4). It would be interesting to determine whether shell abnormalities (showing different degrees of severity) are viable or lethal by studying the course of larval development of the affected larvae. The answer will allow a better standardisation of the results obtained by different research teams. The impacts of various contaminants on embryo-larval development have been studied in different bivalve species, and embryotoxicity is especially well documented in the Pacific oyster. (e.g. His *et al.*, 1999; Lyons *et al.*, 2002; Cachot *et al.*, 2006; Wessel *et al.*, 2007; Libralato *et al.*, 2008; Akcha *et al.*, 2012. When the concentrations inducing embryotoxicity in *C. gigas* are compared for different types of chemicals, it appears that glyphosate-based herbicides are relatively weakly toxic in terms of their effect on embryo-larval development at a minimum concentration of 1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (for  $R_{\text{EX}}$ ). Nice *et al.* (2000) reported a delay in the differentiation of D-shaped larvae exposed to 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  4-nonylphenol; nevertheless, after 48 h, the number of D-shaped larvae in the 3 lowest concentrations (0.1, 1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) did not differ significantly from the controls, whereas less than 10% of the D-shaped larvae were normal at 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . PAHs are well known for their toxicity, and concentrations as low as 2.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (benzo[a]pyrene) and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (pyrene) induced abnormal embryo-larval development (Lyons *et al.*, 2002). Wessel *et al.* (2007) observed embryotoxicity of benzo[a]pyrene from the lowest concentration tested (0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and the threshold of 50% of abnormalities reached at 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; by contrast, ethinylestradiol (a compound in contraceptive pills) had no effect on larval development for the range of tested concentrations (up to 0.425  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Compared to the glyphosate-based herbicides tested in the current study, metals were revealed to also be more toxic, and the  $\text{EC}_{50}$  values reported by His *et al.* (1999) for  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  and  $\text{CuSO}_4$  were 12.3 and 37  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. This toxicity justified the use of  $\text{CuSO}_4$  as a positive control. Among pesticides, atrazine and simazine (herbicides that are now banned in several European countries) exerted no deleterious effect for concentrations  $\leq 1,000 \mu\text{g L}^{-1}$  (abnormality rates  $<5\%$ ), a slight effect at 2,500 and 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $\sim 15\text{-}20\%$ ) and a drastic effect at 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (75%) (Robert *et al.*, 1986). These authors added that in the field, herbicides may also play an indirect role in the development of oyster larvae by curbing the growth of plankton. Aside from metals, His *et al.* (1999) tested 3 pesticides, methiocarb (molluscicide), dinoterb and glyphosate (herbicides), and they concluded that dinoterb was the only pesticide that was toxic in

the range of tested concentrations (up to 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), with an  $\text{EC}_{50}$  of 72.2  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Endosulfan is an insecticide that was investigated by Wessel *et al.* (2007), who demonstrated an increase in the number of abnormal D-shaped larvae according to a gradient of concentrations; this increase became statistically significant at the highest concentration of 122  $\mu\text{g L}^{-1}$ . With regards to glyphosate, His *et al.* (1999) found no embryotoxic effects of this herbicide (tested up to 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) on the embryo-larval development of either *C. gigas* or the sea urchin *Paracentrotus lividus*. More recently, Akcha *et al.* (2012) tested the potential embryotoxicity of low concentrations of two herbicides : diuron (banned in France since December 2008 ; 0.05-0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and glyphosate, plus its commercial formulation, Roundup Express® ( $\text{R}_{\text{EX}}$ ) (0.5 to 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). In the narrow and low range of concentrations tested, these authors demonstrated a significant toxic effect of diuron on embryo-larval development from 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$ . By contrast, they found no evidence of embryotoxicity for glyphosate in 2 experiments (corresponding to 2 couples of genitors) and toxicity from a concentration as low as 2.50  $\mu\text{g L}^{-1}$  in another experiment, which was most likely performed with genitors that were especially sensitive. Indeed, the controls of this third experiment showed an abnormality rate that was too high ( $\sim 30\%$ ) to validate this experiment according to the standardised AFNOR procedure. Finally, Akcha *et al.* (2012) indicated no embryotoxic effect of  $\text{R}_{\text{EX}}$  and found a higher level of abnormal D-larvae after exposure to glyphosate versus  $\text{R}_{\text{EX}}$ . It has already been reported that abnormal embryo-larval development could be explained by the accumulation of unrepaired DNA lesions. In this context, Wessel *et al.* (2007) conducted a study to determine both embryotoxicity and genotoxicity in the same batch of fecundated embryos exposed to pollutants. These authors found a positive and significant correlation between genotoxicity (assessed by the comet assay) and embryotoxicity. In adult oysters exposed to diuron (0.30 and 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), Bouilly *et al.* (2007) showed a significant increase of the aneuploidy level and a transgenerational effect. Exposures of spat and adult oysters to diuron (Bouilly *et al.*, 2007; Luna-Acosta *et al.*, 2012) or to a mixture of pesticides including glyphosate (Gagnaire *et al.*, 2007) induced significant changes in immunological parameters. Compared to juveniles or adults, studying the defence mechanisms of very early life stages is far more difficult to assess, and this topic is poorly documented in bivalves. Nevertheless, Thomas-Guyon *et al.* (2009) indicated that pro-phenoloxidase (proPO) activity, which plays an important function in non-self recognition, was expressed early in *C. gigas* (from 6 h embryos) and reached a maximum at 21 h. Damiens *et al.* (2004) investigated the capability to regulate oxidative stress in D-shaped larvae of *C. gigas* exposed to 2 insecticides : carbofuran (100 and

1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and malathion (100 and 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). These authors concluded that 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of carbofuran could induce increases in both catalase and glutathione S-transferase (GST) activities, whereas this increase only concerned catalase activity with 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  malathion. Regardless of the insecticide and the concentrations used, the TBARS level (expression of the lipid peroxidation) did not differ significantly between the control and exposed larvae ; this result suggested that D-shaped larvae have means of regulating oxidative stress.

#### 3.4.4 Sensitivity of various aquatic species to glyphosate and AMPA

Among aquatic organisms, the biological models that have classically been used to guide European legislations on contaminants including pesticides are algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Navicula pelliculosa* in freshwater ; *Skeletonema costatum* in seawater), crustaceans (*Daphnia magna* in freshwater and *Americamysis bahia* in seawater) and fishes (*Cyprinus carpio* in freshwater and *Oncorhynchus mykiss*, which is an amphidromous species) (??). In the present study, no  $\text{EC}_{50}$  values could be calculated for the metamorphosis tests, and no comparisons could thus be made with biological models used in regulatory studies. By contrast, the  $\text{EC}_{50}$  value computed for the embryotoxicity tests with exposures to glyphosate (28.315  $\text{mg L}^{-1}$ ) was lower than the values reported for *O. mykiss* (38  $\text{mg L}^{-1}$ ), *D. magna* (40  $\text{mg L}^{-1}$ ), *A. bahia* (40  $\text{mg L}^{-1}$ ), *N. pelliculosa* (42  $\text{mg L}^{-1}$ ) and *C. carpio* (115  $\text{mg L}^{-1}$ ) (??). For AMPA, limited  $\text{EC}_{50}$  data are available, but it appears that the  $\text{EC}_{50}$  value calculated for embryotoxicity in *C. gigas* (40.617  $\text{mg L}^{-1}$ ) was again lower than that indicated for *O. mykiss* (520  $\text{mg L}^{-1}$ ) and *D. magna* (690  $\text{mg L}^{-1}$ ). Glyphosate and AMPA thus appeared to be more toxic to the Pacific oyster compared to the regulatory model organisms. It could therefore be suggested that the embryotoxicity test *C. gigas* could be a sensitive endpoint for ecotoxicological evaluation. Unfortunately, no comparisons could be made for  $\text{R}_{\text{EX}}$  and  $\text{R}_{\text{AT}}$  because the ecotoxicological data needed to evaluate the effects of commercial formulations on regulatory species are lacking.

#### 3.4.5 Comparison of the effects of glyphosate/AMPA and Roundup® formulations

In the present study, both  $\text{R}_{\text{EX}}$  and  $\text{R}_{\text{AT}}$  appeared to be far more toxic than glyphosate and its metabolite for the two endpoints studied. In fact, the  $\text{EC}_{50}$  values computed for the embryos exposed to RAT were 16.93- and 24.29-fold lower by comparison with those calculated for glyphosate and AMPA, respectively. The corresponding factors for

$R_{EX}$  compared to glyphosate and AMPA reached 24.99 and 35.85, respectively. Using 7 test organisms (i.e. *marine bacterium*, 2 species each of microalgae, ciliate and planktonic crustacea), Tsui and Chu (2003) highlighted the toxicity of the main adjuvant in Roundup®, POEA, and ranked the following toxicity order : POEA > Roundup® > glyphosate acid > IPA salt of glyphosate. Except in microalgae, POEA accounted for more than 86% of Roundup®'s toxicity, and the toxicity contribution of POEA was shown to be species-dependent. Howe *et al.* (2004) compared the potential toxicity of glyphosate, POEA and 6 glyphosate-based commercial formulations to 4 amphibian species (*Rana ssp.* and *Bufo americanus*). The toxicity of commercial formulations varied with both species and developmental stages, and in *Rana clamitans*, for example, no significant acute toxicity was observed for glyphosate while POEA was found to be the most toxic. In the blackworm, *Lumbriculus variegatus*, exposure to Roundup Ultra® led to a significant increase in both soluble glutathione S-transferase (sGST) and superoxide dismutase (SOD); exposure to glyphosate led to an elevation of sGST but to a lesser extent (Contardo-Jara *et al.*, 2009). In melanophores from *Xenopus laevis*, Hedberg and Wallin (2010) reported that Roundup® formulations inhibit intracellular transport through the disassembly of the cytoskeleton, possibly by interfering with intracellular  $Ca_{2+}$ -balance. According to Peixoto (2005), glyphosate alone did not impact the bioenergetics of isolated rat liver mitochondria, in contrast to Roundup® formulation products. Pieniążek *et al.* (2004) concluded that Roundup Ultra® induced more changes in the function of human erythrocytes than its active substance, which is most likely a result of the properties of its additives. In the backdrop of above information, it would be interesting to test the effect of POEA on the embryo-larval development and metamorphosis of *C. gigas* in future studies.

### 3.4.6 Level of contamination of aquatic ecosystems by glyphosate-based herbicides and perspectives

Some authors have reported relatively high environmental concentrations of glyphosate, with peaks reaching  $137 \mu\text{g L}^{-1}$  in Mediterranean river ecosystems (Puértolas *et al.*, 2010). In hydrographical systems located in Normandy (France), the glyphosate and AMPA concentrations recorded in 2006 never exceeded  $1.43 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $1.19 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively (Agence de l'Eau Seine Normandie, pers. comm.). Glyphosate analyses in seawater are especially difficult to achieve because of the presence of salts, but the limited data available suggests concentrations of glyphosate of  $1.20 \mu\text{g L}^{-1}$  in shellfish production areas (Burgeot *et al.*, 2008). Buisson *et al.* (2008) demonstrated that pesticides

such as diuron could be found in seawater at low tide with maximum concentrations of  $0.132 \mu\text{g L}^{-1}$ . The results provided by the current study showed that calculated  $\text{EC}_{50}$  values were much higher than environmental concentrations. We chose to test ranges of concentrations that could be considered environmentally unrealistic but that also included potential environmental concentrations ( $0.1$  and  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Besides the  $\text{EC}_x$  values, it is also interesting to consider the PNEC (predictive no effect concentration). In the frame of the European water framework directive, environmental quality standards (EQSs) are required for substances falling under Annex VIII like glyphosate (Official Journal of the European Union, 2008). In 2010, the UK Technical Advisory Group proposed PNECs values calculated for both fresh and saltwater and both long-term and short-term experiments (Maycock *et al.*, 2012). These values calculated by considering available ecotoxicity data for glyphosate in saltwater are potentially in the range  $33$  to  $398 \mu\text{g L}^{-1}$ . These values are higher ( $\times 33$  to  $398$ ) than the concentrations usually recorded in rivers of Normandy ; unfortunately, this calculation cannot be performed for Roundup<sup>®</sup>, which was revealed to be more toxic. Additional long-term exposures ( $>1$  month) of spat to low doses of pesticides are planned that will allow us to study the effects of these types of contaminants in a more realistic way. Finally, this study focused only on the effects of individual contaminants (glyphosate and AMPA) or commercial formulations (glyphosate and additives), whereas contamination by pesticides is generally multiple in the environment. Further studies should therefore include mixtures of pesticides which could interact differently to induce the biological effects.

### 3.5 Conclusion

Our study provides the first data for both embryotoxicity and metamorphosis tests conducted in a marine bivalve. The two endpoints studied appeared to be convenient to determine the potential harmful effects on a non-target species, *Crassostrea gigas*. For example, the  $\text{EC}_{50}$  values computed for the embryotoxicity tests with glyphosate and AMPA were lower than the values reported for regulatory model organisms. In the Pacific oyster, the embryotoxicity test appeared more sensitive but also a little more difficult to assess compared to the metamorphosis assay. In addition to the rates of embryo-larval abnormalities, the distinction of the types of abnormalities could allow a better standardisation of the method in order to avoid subjectivity. In terms of methodology, it is also important to verify the true concentrations, and to compare them to the nominal concentrations. In comparison to the active ingredients, fewer ecotoxicolo-

gical data are generally available about the by-products and the commercial formulations. In the current study, this is especially unfortunate because R<sub>EX</sub> and R<sub>AT</sub> appeared to be far more toxic for the two endpoints studied. According to the toxicity classification for aquatic species (Giesy et al., 2000), glyphosate and AMPA can be considered as « slightly toxic » (embryotoxicity) or « practically nontoxic » (metamorphosis assay) whereas the two commercial formulations can be classified among the « moderately toxic » molecules for both endpoints. Further studies including chronic exposures on spat and adults to definitely conclude on the toxicity of glyphosate-based herbicides to the Pacific oyster are required.

## **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge the staff of the laboratory CNRS-INEE FRE BioMEA and all of the colleagues of the « Chronexpo scientific community », especially Professor Geoffrey Millward, Plymouth University, UK. This study was supported by the Region Basse-Normandie and the European Program Interreg IVA « Chronexpo » coordinated by Dr. Bruno Fievet from IRSN (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire) of Cherbourg-Octeville. Finally, we would like to thank the anonymous reviewers for their constructive comments for improving the manuscript.





## Chapitre 4

# Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200®) on two life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

Antoine Mottier, Jennifer Pini, Katherine Costil

*Short communication acceptée dans The Journal of Toxicological Sciences*

### Abstract

Surfactants used in herbicide formulations are generally considered inert with no toxic effects on animals. Polyethoxylated tallow amines (POEAs) are non-ionic surfactants used in many herbicide formulations to promote the penetration of the active matter into plant cuticles. The present study aimed to assess the toxicity of a POEA surfactant system, the Genamin T-200®, on two larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The embryotoxicity of Genamin T-200® was quantified after 36 hours of exposure, considering both arrested development and abnormalities in D-shaped larvae. The ability of pediveliger larvae to metamorphose was studied after 24 h exposure to Genamin T-200®. According to the European toxicity classification, the present results suggest that Genamin T-200® could be considered very toxic to embryo larval development, with an  $EC_{50}$  of 262  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and toxic to metamorphosis processes with an  $EC_{50}$  of 3027  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The high toxicity of glyphosate-based formulations compared to the active ingredient and its by-product appears to be due primarily to surfactants.

## 4.1 Introduction

Glyphosate-based herbicides including Roundup® are widely used and are among the most-used pesticides in the world (Howe *et al.*, 2004). Glyphosate could be considered a contaminant to aquatic ecosystems ; in fact, it has been measured at  $\mu\text{g L}^{-1}$  levels (Kolpin *et al.*, 2006) and even  $> 100 \mu\text{g L}^{-1}$  (Puértolas *et al.*, 2010) in streams in agricultural regions. Glyphosate-based herbicides generally consist of an active ingredient and one or more adjuvants that aid or modify the action of the active ingredient (Van Valkenburg, 1982; Foy, 1987). Some authors have already reported that non-ionic surfactants interacting with plant cuticles are highly water soluble (Hess and Foy, 2000) and can enter aquatic ecosystems after heavy rain episodes. The effects of glyphosate on aquatic organisms are generally considered to be moderate (Mann and Biwell, 1999 ; Bringolf *et al.*, 2007), but several studies have shown that commercial formulations containing glyphosate are more toxic than glyphosate alone due to the addition of surfactants (Folmar *et al.*, 1979 ; Mann and Biwell, 1999 ; Tsui and Chu 2003). The most common adjuvants in glyphosate-based formulations are polyethoxylated tallow amines (POEAs), which are used to promote the penetration of the active ingredient (e.g., glyphosate) into plant cuticles (Relyea, 2005). POEAs are diethoxylates of tallow amines that are characterised by the ratio of oxide :tallow-amine, which ranges from 5 :1 to 25 :1 (Brausch and Smith, 2007). Although adjuvants are considered biologically inert by manufacturers and protection agencies, various studies have demonstrated that POEAs are toxic to aquatic organisms such as *Daphnia magna* (Brausch *et al.*, 2007), the freshwater fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus* (Brausch and Smith, 2007), the freshwater mussel *Lampsilis siliquoidea* (Bringolf *et al.*, 2007) and four amphibian species (Howe *et al.*, 2004). A study by Mottier and his collaborators 2013 reported that Roundup® formulations are more toxic to D-shaped and pediveliger larvae than glyphosate alone or its by-product, aminomethylphosphonic acid (AMPA). It was thus interesting to evaluate the effects of an adjuvant system alone on embryotoxicity and the success of metamorphosis in the Pacific oyster, which is one of the major mollusc species cultivated in France and throughout the world.

## 4.2 Materials and methods

Genanim T-200® was purchased from an agricultural cooperative. It contains POE-15 at a concentration of  $732 \text{ g L}^{-1}$  (Mesnage *et al.*, 2012). All of the solutions were prepa-

red by diluting Genamin T-200® in natural sterilised seawater (0.22 µm, Steritop® Milipore). The standardised AFNOR procedure (AFNOR, 2009) was used to assess the effect of POEA on embryo-larval development. According to this procedure, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Alfa Aesar GmbH; Karlsruhe, Germany) was used as a positive control, with five concentrations ranging from 20 to 100 µg L<sup>-1</sup>. Nine concentrations of Genamin T-200® (+ control) ranging from 0.1 to 1000 µg L<sup>-1</sup> were tested (Fig. 4.1). Three independent experiments (corresponding to three different pairs of genitors) were conducted, and each concentration was tested in triplicate. The detailed protocol used to obtain embryos has previously been published (Mottier *et al.*, 2013). Briefly, gametes from males and females were obtained by thermal stimulation of individualised conditioned oysters. The oocytes and spermatozoa of the selected parents were sieved and then mixed (1 :6). Twenty minutes post-fertilisation, the embryos were distributed into pillboxes containing 25 mL of natural sterilised seawater. Embryos were exposed at a density of 60,000 L<sup>-1</sup> without feeding, aeration or light. After 36 h at 22 ± 1°C, the embryos or D-shaped larvae were fixed using an 8% formalin solution. A minimum of 100 individuals was observed per replicate using an inverted binocular microscope at 400x magnification (Leica200® DM IRB). Two categories could be distinguished : normal D-shaped larvae and abnormal individuals, the latter including embryos in late arrested development or D-shaped larvae showing shell/hinge abnormalities, mantle abnormalities (hypertrophies) or shell and/or hinge + mantle abnormalities. For each concentration, net percentages of normal development, NPN<sub>e</sub> (adjusted for the controls), were calculated (Mottier *et al.*, 2013).

The metamorphosis rates of pediveliger larvae (ready for metamorphosis) were calculated after exposure to Genamin-T200®. Thirteen concentrations (+ control) ranging from 0.1 to 10000 µg L<sup>-1</sup> were tested. Three independent experiments (corresponding to three different larva batches) were conducted and each concentration was tested in triplicate. Twenty-one-day-old pediveliger larvae were provided by the SATMAR (Société Atlantique de MARiculture) hatchery (Barfleur, France). Larvae were exposed in multiwell plates in a final volume of 1.5 mL of natural sterilised seawater. Larval density was set between 50 and 80 larvae per well. To promote metamorphosis, epinephrine (Sigma Aldrich®) was added at a final concentration of 10<sup>-4</sup> M (Coon and Bonar, 1987). Experiments were conducted at 22°C without feeding, aeration or light. After 24 h, larvae were fixed using an 8% formalin solution. The metamorphosis rate was evaluated by counting metamorphosed versus non-metamorphosed larvae. A me-

tamorphosed larva presents an obvious loss of its velum, new shell growth and well-developed gills. The results of the metamorphosis assay in exposed organisms were expressed as net percentages of metamorphosis,  $NPM_e$  (Mottier *et al.*, 2013). Non-linear regressions (Hill equation) were used to calculate  $EC_{50}$  (effective concentration for an effect on 50% of the individuals tested) values for each contaminant. These regressions were conducted using the Excel<sup>®</sup> macro REGTOX (Vindimian, 2012). The data concerning embryotoxicity were subjected to logit transformation. As the data met the assumptions of normality and homoscedasticity, they were tested using one-way ANOVAs. Multiple comparison tests (Student-Newman-Keuls) were undertaken to distinguish differences among different groups. The metamorphosis data were not normally distributed even with various transformations. A one-way Kruskal and Wallis test was thus performed, followed by multiple comparison tests (modified Student-Newman-Keuls for non-parametric data). All of the analyses were conducted using STATISTICA 8.0 software (Statsoft<sup>®</sup>, Tulsa, OK, USA).

### 4.3 Results

Considering the requirements of the standardised procedure (AFNOR, 2009), all of the embryotoxicity assays performed could be validated. In fact, high levels of fecundation were recorded, and no oocytes were observed after 36 h. The rate of normal larvae in control groups reached at least 80% for the three experiments (from  $80.61\% \pm 2.55$  to  $91.36\% \pm 2.38$ ). Finally, the  $EC_{50}$  recorded for  $Cu^{2+}$  exposures (positive control) always fell between 6 and  $16 \mu g L^{-1}$ . Between 0.1 and  $10 \mu g L^{-1}$  of POEA, no significant effects on embryo-larval development were recorded and  $NPN_e$  ranged from 102.6% to 94.91% (Fig. 4.1A). A sharp drop in normal larvae rates was observed between 100 ( $NPN_e = 71.86\%$ ) and  $600 \mu g L^{-1}$  ( $NPN_e = 11.16\%$ ), leading to a rate of 100% of abnormalities at concentrations of  $800 \mu g L^{-1}$  and above. Although the data have been normalised according to the rates calculated for controls ( $NPN_e$ ), a strong heterogeneity of the response of larvae was observed between the concentrations of 100 and  $800 \mu g L^{-1}$  with a standard deviation ranging from 15% to 26.83%. Finally, the value of  $EC_{50}$  estimated from non-linear regression was  $262 \mu g L^{-1}$ . The rate of metamorphosis observed for the control group did not differ from those computed for concentrations from 0.1 to  $2500 \mu g L^{-1}$ , and  $NPM_e$  varied from 84.73% to 99.42% (Fig. 4.1B). Despite substantial heterogeneity in the response of larvae, the process of metamorphosis appeared to be significantly affected from a concentration of  $3000 \mu g L^{-1}$  : only 48.04% of larvae were

metamorphosed. A huge decrease in metamorphosis rates was observed at 3500  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{NPM}_e=23.30\%$ ) and 4000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{NPM}_e=5.21\%$ ), and no metamorphosis occurred at 6000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The  $\text{EC}_{50}$  estimated from non-linear regression was 3027  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

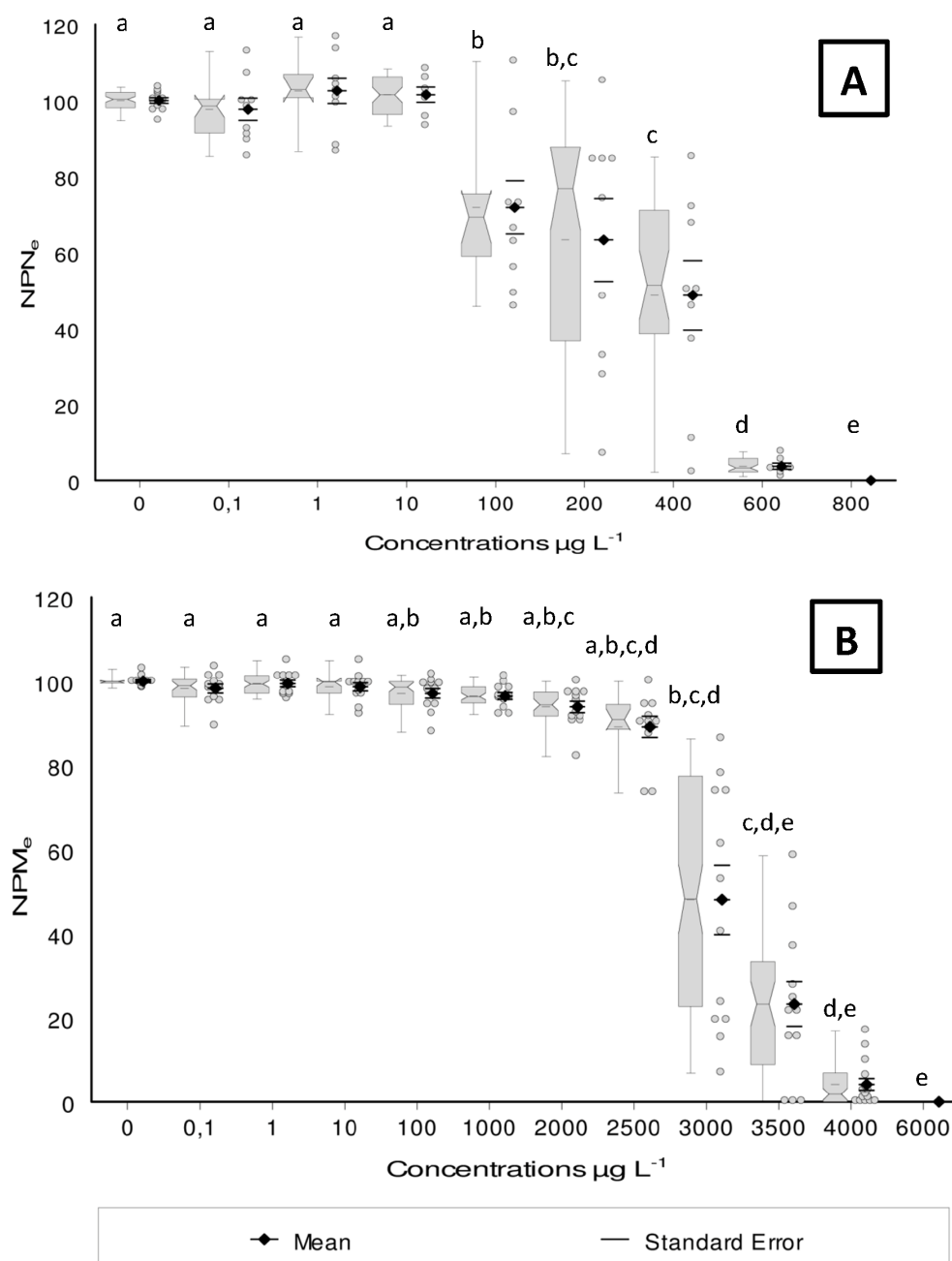


FIGURE 4.1 – **A.** Net percentages of normal development ( $\text{NPN}_e$ ) in *Crassostrea gigas* embryo-larvae observed after 36 h of exposure to Genamin T-200® at concentrations ranging from 0.10 to 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  (as  $\text{NPN}_e$  at 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  is equal to 0.00%, it is not represented). **B.** Net percentages of metamorphosis ( $\text{NPM}_e$ ) in *C. gigas* pediveliger larvae observed after 24 h of exposure to Genamin T-200 at concentrations ranging from 0.10 to 6000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (as  $\text{NPM}_e$  from 6000  $\mu\text{g L}^{-1}$  are equal to 0.00%, they are not represented). The concentrations that do not share a letter are significantly different. Data are illustrated with a box and whisker diagram : the bottom and top of the box correspond to the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, and the band near the middle of the box represents the median. The ends of the whiskers represent the minimum and maximum of all of the data for a given concentration. All data are plotted next to the box ; black dots are used to plot the mean and black dashes to represent standard errors.

## 4.4 Discussion and conclusion

The present results are the first regarding the effect of a POEA adjuvant on marine mollusc larvae. The results obtained with the two different bioassays showed an important heterogeneity in the responses of larvae (e.g., concentration of 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{NPN}_e$  and concentration of 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{NPM}_e$ ). This heterogeneity appeared only at concentrations that exhibited a significant effect on  $\text{NPN}_e$  or  $\text{NPM}_e$ , which could be explained by the genetic differences between parents. In fact, the larvae used for embryotoxicity or metamorphosis tests came from different pairs of genitors and have different genetic backgrounds, which could explain the different responses to contaminants. Furthermore, the data from the metamorphosis assay did not follow a normal distribution regardless of the transformation used; the statistical tests used were thus non-parametric and less sensitive for detecting potential significant differences between treatments. Early life stages are known to be especially sensitive to toxicological injuries (Jha *et al.*, 2000), and essential biological processes occur during the very first stages of life (Gilbert, 2003). The results showed a greater sensitivity of embryos and D-shaped larvae to Genamin T-200<sup>®</sup> exposure compared to 21 day old pediveliger larvae ( $\text{EC}_{50}$  of 262  $\mu\text{g L}^{-1}$  versus 3027  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). This trend has already been reported in Mottier *et al.* (2013) : D-larvae were highly sensitive to glyphosate, AMPA and two Roundup<sup>®</sup> formulations compared to pediveliger larvae. The mechanisms of toxicity of POEA surfactants are not fully known, but the observed effect on embryo-larval development and metamorphosis could be explained by results from previous studies. Some authors have reported that non-ionic surfactants interact with both the lipid bilayer membrane and membrane proteins, leading to reduced oxygen transport across the membrane (Pärt *et al.*, 1985; Cserhádi, 1995; Lindgren *et al.*, 1996). Partearroyo *et al.* (1991) showed that surfactant caused lysis of the gill epithelial cells of *Oncorhynchus mykiss* leading to asphyxiation or loss of osmotic stability. The genotoxicity of Roundup<sup>®</sup> and adjuvant alone have also been demonstrated in blood cells of *Anguilla anguilla* exposed for one or three days to Roundup<sup>®</sup> and POEA (Guilherme *et al.*, 2012).

The results of the present study are in accordance with those obtained by Mottier *et al.* (2013) : there, glyphosate and AMPA presented very limited embryotoxicity ( $\text{EC}_{50}$  : 28,315 and 40,617  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and toxicity to the metamorphosis processes could not be observed at less than 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . By contrast, commercial formulations containing glyphosate exhibited a greater toxicity to embryo-larval development ( $\text{EC}_{50}$  : 1133 and 1675  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and metamorphosis (6366 and 6060  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). According to Mottier *et al.*

(2013) and corroborated by the present work, it appears that the toxicity of Roundup® observed for embryo-larval development and metamorphosis comes primarily from the formulation's adjuvants. Based on the European toxicity classification for aquatic species (Giesy et al., 2000), Genamin T-200® could be classified as "very toxic" in terms of embryotoxicity and "toxic" based on the metamorphosis assay.

## **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge the staff of the laboratory CNRS-INEE FRE BioMEA and all of our colleagues in the "Chronexpo scientific community". This study was supported by the Region Basse-Normandie and the European Program Interreg IVA Chronexpo supervised by Dr. Bruno Fievet from IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) of Cherbourg-Octeville. We also thank the SATMAR team, who kindly provided us pediveliger larvae.





## Chapitre 5

# Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

Antoine Mottier, Valérie Kientz-Bouchart, Christelle Dubreule, Antoine Serpentine, Jean Marc Lebel, Katherine Costil

*Aquatic Toxicology* 146 (2014) 165-175

### Abstract

Studies have shown that pesticides are sometimes detected at rather high levels in seawater and it has been suggested that these chemical compounds could act as additional stress factor for oysters cultured in coastal environments. The effects of pesticides on marine molluscs could be particularly harmful in the early stages which correspond to critical life stages. This study aimed to assess the effects of Mecoprop, Mecoprop-p and their degradation compound 2-methyl-4-chlorophenol on two larval stages of *Crassostrea gigas*. Embryotoxic effects were assessed on veliger larvae after 36 h exposures, and both percentages of normal larvae and types of abnormalities were taken into account. The effects of the three substances were evaluated on 21-day-old pediveliger larvae by calculating metamorphosis rates after 24 h exposures. The results of the embryotoxicity assay indicated that 2-methyl-4-chlorophenol was more toxic ( $EC_{50}$  : 10.81 mg L<sup>-1</sup>) than its parent compounds ( $EC_{50}$  mecoprop : 42.55 mg L<sup>-1</sup>;  $EC_{50}$  mecoprop-p : 78.85

mg L<sup>-1</sup>). Mecoprop in particular injured shell formation with an increase of shell abnormalities following herbicide concentrations. The active substances were not toxic to metamorphosis processes, but 2-MCP was revealed to be more toxic to the success of metamorphosis (EC<sub>50</sub> : 7.20 mg L<sup>-1</sup>) than to embryo-larval development. However, the toxic concentrations were several orders of magnitude higher than environmental concentrations.

## 5.1 Introduction

Mecoprop (MCP) is a chlorophenoxy herbicide used for broad-leaved weeds in cereal crops, grasslands and lawns, and it acts as a synthetic auxin. This is a racemic mixture containing equal amounts of two different stereoisomers. Only the (R)-(+ isomer (D form) is herbicidally active, with the (S)-(-) isomer holding no growth-promoting herbicidal activity (Fletcher *et al.*, 1995). Mecoprop-p (MCP-P) is a formulation containing >93% of the active (R)-(+) enantiomer. MCP and MCP-P are highly water soluble (20°C) with values of 734 mg L<sup>-1</sup> and 869 mg L<sup>-1</sup>, respectively (?). For these highly polar substances, the low values of both log K<sub>ow</sub> (-0.19–0.02) and K<sub>OC</sub> (31) indicate that they are virtually non-bioaccumulative and they do not sorb appreciably to soil constituents (Tomlin, 1997; PPDB, 2013). They can leach easily from soils and are routinely detected in both surface waters and ground waters (Harrison *et al.*, 2003). In Ontario streams, the enantiomer fractions (EF=R(+) / [R(+) + S(-)]) >0.5 of mecoprop in stream water samples during 2006-2007 were related to the replacement of racemic mecoprop by single (+) enantiomer mecoprop-p after 2004 (Kurt-Karakus *et al.*, 2010). Vink and his collaborators (1997), investigating pesticide biotransformation in 11 different surface waters located in a polder area, have reported a longer half-life for mecoprop (DT<sub>50</sub> : 3-1,400 days) compared to three other pesticides (including MCPA : 2-347 days). Finally, MCP and MCP-P are considered non-persistent in soils but very persistent in water (PPDB, 2013). 2-MCP is a degradation product of different parent pesticides including MCP and MCP-P (Oh and Tuovinen, 1991). Compared to the parent pesticides, data about its fate in the environment or its effects on ecotoxicological models are less available for this chemical transformation product. According to the Pesticide Properties DataBase (PPDB, 2013), 2-MCP is highly water-soluble and slightly bio-accumulates in aquatic organisms.

Littoral ecosystems including shellfish farming areas can be impacted by various contaminants originating primarily from terrestrial inputs (Auby *et al.*, 2007; Buisson

*et al.*, 2008; Burgeot *et al.*, 2008). Among pollutants, pesticides can enter aquatic systems via inputs from accidental or controlled sources (urban and industrial discharges) and from diffuse sources originating from domestic and agricultural activities (Akcha *et al.*, 2012). Pesticides and especially herbicides are listed because of their high use in agricultural and non-agricultural activities. In Europe, pesticide consumption has declined by 50% compared to the average in the 1980s, but France remains the largest consumer of pesticides (Zhang *et al.*, 2011). In France in 2007, fungicides and bactericides (36,919 tons) corresponded to the most-used pesticide types, followed by herbicides (26,808 tons) and finally insecticides (2,101 tons) (Zhang *et al.*, 2011; EUROSTAT, 2012). For herbicide use, the top 6 consumers are the USA, Mexico, Thailand, Colombia, Malaysia and France (FAO, 2013). In this context, the European legislation including the Water Framework Directive (2000/60/EC) and the Marine Strategy Framework Directive (2008/56/EC) aim to take all measures necessary to achieve or maintain a healthy ecological state of the coastal environment by 2015 and 2020, respectively. This objective includes a reduction of pesticide inputs into littoral areas. In France, water quality is especially well surveyed in lotic and lentic ecosystems, and pesticides are analysed in a large network of localities. In 2007, the 15 most frequent molecules were herbicides, and among them, aryloxyalkanoic acids such as mecoprop and MCPA (which can both be degraded into 2-methyl-4-chlorophenol, 2-MCP) were quantified in 6.7 and 5.5% of the monitored sites (Commissariat Général au Développement Durable, 2010). Compared to glyphosate and its metabolite (AMPA), which are the most frequently detected molecules (in 22.2 and 43.1% of the sites, respectively), the frequency of mecoprop and MCPA quantification might be considered rather low. However, the presence of these molecules in French freshwater environments is not at all negligible. For example, in Normandy, which provides approximately 20% of French oyster production each year, aryloxyalkanoic acids were in the top 10 of the most-used herbicides; in 2006, the higher values recorded in rivers reached  $0.084 \mu\text{g L}^{-1}$  (mecoprop) and  $0.091 \mu\text{g L}^{-1}$  (MCPA) (Agence de l'Eau Seine Normandie, pers. com.). In Switzerland, the quality goal for pesticides in surface waters ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was frequently exceeded for mecoprop (Gerecke *et al.*, 2002). In this country, Wittmer and his collaborators (2010) have reported seasonal peak concentrations (e.g.,  $1.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) driven by rain events from urban and agricultural areas; moreover, in the effluent of the studied storm sewer, these authors have indicated concentrations in mecoprop as high as  $32 \mu\text{g L}^{-1}$  from May to September and concluded that seasonal inputs cannot be neglected. The results of pesticide analyses strongly depend on the type of pesticide use (e.g., agricultural or

non-agricultural uses) and the study period. The low levels of mecoprop frequently measured in the Danube River (maximum of  $0.017 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and its major tributaries (maximum of  $0.025 \mu\text{g L}^{-1}$ ) have been imputed to the period of the survey, which was conducted in August and September (2007), an atypical application period for this pesticide (Loos *et al.*, 2010). In the nine stations studied in the region of Barcelona (Spain), average and maximum concentrations of mecoprop were higher in April ( $0.006$  and  $0.025 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively) than in October (2004) ( $0.004$  and  $0.007 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively) (Kuster *et al.*, 2008); a similar result was obtained by these authors for MCPA, but for this herbicide, all of the values were higher (e.g., maximum concentrations of  $1.286 \mu\text{g L}^{-1}$  in April and  $0.067 \mu\text{g L}^{-1}$  in October). In Ontario streams in 2006-2007, mecoprop was detected in 53% of the monitored locations with a concentration range of  $0.0005$ - $0.829 \mu\text{g L}^{-1}$  and a mean of  $0.062 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\pm 0.144$ ) (Kurt-Karakus *et al.*, 2010). The mass of mecoprop discharged in agricultural drainage waters directly onto salt marsh has been measured by Fletcher *et al.* (1995) and reached a value of  $25.8 \mu\text{g L}^{-1}$ . The concentrations of pesticides are generally less monitored in estuarine and coastal waters than in freshwaters. Nevertheless, these hydrosystems are not spared (Scott *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2004; Auby *et al.*, 2007; Burgeot *et al.*, 2008; Buisson *et al.*, 2008). Of the 21 molecules surveyed in an oyster farming area (Marennes-Oléron), four pesticides including mecoprop were detected in seawater (Gagnaire, 2005), and there has been growing concern over the adverse effects of these compounds in non-target aquatic organisms.

Among the rare ecotoxicological data, the concentration leading to the death of 50% ( $\text{LC}_{50}$ ) of a fish population exposed for 96 h can be cited for three types of substances :  $2.3 \text{ mg L}^{-1}$  in *Lepomis macrochirus* exposed to 2-MCP;  $>100 \text{ mg L}^{-1}$  in an “unknown fish” species exposed to MCPP-P and  $240 \text{ mg L}^{-1}$  in *Oncorhynchus mykiss* exposed to MCPP (PPDB, 2013). These values have to be considered with caution because they were recorded in different species, but they suggest a higher toxicity for the degradation product (PPDB, 2013). This conclusion is reinforced by the results of the classical ecotoxicological test performed in *Daphnia magna* for 48 h and provided by the same database (2013) :  $\text{EC}_{50}$  values of  $0.29 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $91 \text{ mg L}^{-1}$  and  $>200 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively, for 2-MCP, MCPP-P and, MCPP which induces a low effect in the crustacean species. Low effects of mecoprop have also been reported by (Nitschke *et al.*, 1999) in *Daphnia magna* (no immobilisation up to a concentration of  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), in *Scenedesmus subspicatus* (no inhibition of algal growth up to  $180 \text{ mg L}^{-1}$ ) and in the aquatic plant, *Lemna minor* ( $\text{EC}_{50}$  values of  $6.00 \text{ mg L}^{-1}$ ). For the marine copepod *Nitocra spinipes*, a value of  $\text{LC}_{50}$  of  $87,000 \mu\text{g L}^{-1}$  after 96 hours of exposure to MCPP has been calculated by Linden *et al.* (1979).

Apart from these data provided by regulation models in aquatic ecotoxicology, the literature about the effects of MCPP (and MCPP-P) is poorly documented. Few studies have reported the effects of mecoprop alone on the physiology of mammals, including humans (e.g., Hooghe *et al.*, 2000). The impacts of a mixture of five herbicides including mecoprop have been explored on the molecular and physiological responses of the European flounder, *Platichthys flesus* (Evrard *et al.*, 2010). Greco and her collaborators (2011) have reported the combined impact of temperature and a pesticide mixture (mecoprop + 2,4-D + dicamba) on a battery of physiological biomarkers in *Mya arenaria*. A study by Bushek and his collaborators (2007) indirectly concerned oysters, as it assessed the effects of a commercial formulation including 10.6% mecoprop on the proliferation of the parasitic oyster pathogen *Perkinsus marinus*. To our knowledge, only one study has investigated the effects of mecoprop alone on *C. gigas*. Indeed, His and Seaman (1993) investigated the effects of 12 pesticides including mecoprop on veliger larvae from fertilisation to nine days.

Pollutant run-off into the ocean represents a potential threat to marine organisms, especially bivalves living in coastal environments (Renault, 2011). In this context, bivalve molluscs such as mussels and oysters have been postulated as ideal indicator organisms because of their wide geographical distribution, sedentary lifestyle and sensitivity to environmental pollutants. They are thus used in biomonitoring programs such as the American program Mussel Watch and the French program RNO/ROOCH (Goldberg, 1986; Cantillo, 1998). Moreover, bivalve farming corresponds to an important economic activity in many countries, including France, which is the leading producer of oysters in Europe and the fourth in the world. However, French oyster basins sporadically experience high summer mortalities (>30%) that have important socio-economic consequences (Royer *et al.*, 2007; Samain, 2007). These mortality outbreaks may result from multiple extrinsic and intrinsic factors including temperature variations, physiological stress and the presence of contaminants in the environment (Samain, 2007; Burgeot *et al.*, 2008). Burgeot and his collaborators (2008) have reported that the oyster oxidative stress observed in June appeared to correspond with the peak of herbicide contamination in Marennes-Oléron (France). There is a general assumption in ecotoxicology that early life stages (eggs, embryos and larvae) of invertebrates are more sensitive to xenobiotic agents than adults and therefore represent the critical life stages for ecotoxicological studies (Hutchinson *et al.*, 1998; His *et al.*, 1999; Mohamed, 2013). The early development stages of *Crassostrea gigas* are commonly used as sentinel organisms to assess the toxicity of a large variety of pollutants in marine bio-

assays (e.g., Geffard *et al.*, 2002; Lyons *et al.*, 2002; Poirier *et al.*, 2007; Mai *et al.*, 2012; Mottier *et al.*, 2013 because of their relatively high sensitivity. By comparison, the metamorphosis success of bivalve larvae is rarely used as a biological endpoint for the monitoring of pollution in ecotoxicology (His *et al.*, 1997a; Mottier *et al.*, 2013). Regarding the paucity of existing ecotoxicological data relative to MCPP, MCPP-P and 2-MCP, the present study aimed to compare the toxicity of these three substances in a single species : the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In the context of European legislation that essentially concerns parent pesticides, it is particularly interesting to assess the toxicity of degradation products such as 2-MCP, which might be more toxic according to data provided by model organisms classically used in ecotoxicology. The second objective of the study was to assess the usefulness of both embryo-larval toxicity and metamorphosis as toxicity biomarkers in marine ecotoxicology.

## 5.2 Materials and methods

### 5.2.1 Chemical compounds

Mecoprop (MCPP ; [2(4-chloro-2-methylphenoxy) propanoic acid] ;  $C_{10}H_{11}ClO_3$ ) is a mixture of two stereoisomers in an equal proportion and acts as a selective, hormone-type phenoxy herbicide (CAS No : 7085-19-0 ; 99.5% purity). Mecoprop-p (MCPP-P) (CAS No : 16484-77-8) is a formulation containing the (R)-(+ enantiomer with 99% purity. 2-Methyl-4-chlorophenol, abbreviated as 2-MCP ( $C_7H_7ClO$ ) (CAS No : 1570-64-5 ; 99% purity), is a degradation product that could originate from different parent pesticides such as MCPA ( $C_9H_9ClO_3$ ), MCPA-thioethyl ( $C_{11}H_{13}ClO_2S$ ), Mecoprop and Mecoprop-p. All of the pesticides used in this study were provided by Dr. Ehrenstorfer GmbH® (Augsburg, Germany). The herbicide solutions were prepared with natural open sea water sterilised on a 0.22  $\mu m$  membrane (Steritop® Millipore). The concentration ranges were prepared from stock solutions at 500 mg L<sup>-1</sup>. For both endpoints, nominal concentrations corresponding to 0.1, 100 and 10,000  $\mu g$  L<sup>-1</sup> of the chemicals (i.e., MCCP and MCCP-P) were verified (in duplicate) by ultraperformance liquid chromatography (UPLC) and MS-MS detection (in accordance with NF EN ISO 11 369) using a UPLC Acquity with TQD detector (Waters – Milford, MA, USA) and a column Waters Acquity BEH C18-2.1x150 mm, 1.7  $\mu m$ . In accordance with the expected concentration, the samples were diluted or concentrated by solid phase extraction (Oasis – HLB 200 mg - Waters) before analysis. Moreover, the analyses were performed at the beginning and the end of the exposures to verify the variation in the tested concentrations during

the period of the experiments. These analyses were performed once without embryos or larvae to avoid interaction between the physico-chemical and biological processes.

### 5.2.2 Embryotoxicity bioassay and experimental design

Conditioned oysters were purchased from the Guernsey Sea Farm Ltd. hatchery (Guernsey, UK). As previously described in Mottier *et al.* (2013), larvae were obtained using the standardised AFNOR procedure (AFNOR XP-T-906382) published in 2009. Briefly, male and female gametes were obtained by thermal stimulation (successive baths at 16°C or 28°C). The egg density of the selected female was determined with a Mallassez counting cell. Twenty minutes after fertilisation, the embryos were distributed into plastic pillboxes containing 25 mL natural sterilised sea water (0.22 µm, Steritop® Millipore) at a density of 60,000 L<sup>-1</sup> (corresponding to 1500 embryos per pillbox). After 36 h at 22 ± 1°C without feeding, aeration or light, embryos or D-shaped larvae were fixed using 0.5 mL of an 8% formalin solution. A minimum of 100 larvae were counted per replicate using an inverted binocular microscope at 400x magnification (Leica® DM IRB). Observations enabled the calculation of rates of abnormality and the discrimination of types of abnormalities; four categories could be distinguished : normal larvae, mantle abnormality alone (hypertrophies), shell abnormality (with/without additional mantle abnormality), late arrested development and early arrested development (when cells could be distinguished and counted) (Mottier *et al.*, 2013). The results of embryo-larval development in exposed organisms were expressed as net percentages of normal development, NPN<sub>e</sub>, adjusted for the controls (± SEM) (Mottier *et al.*, 2013). For the three molecules tested, two experiments corresponding to two couples of genitors were conducted and, for each experiment, herbicide concentrations were tested in triplicate. Consequently, the minimum number of individuals examined for each concentration was 600. Herbicide concentrations ranged from 0.1 to 100,000 µg L<sup>-1</sup> with a factor of 10x between two consecutive concentrations, this range being tightened between 10,000 and 100,000 µg L<sup>-1</sup> to precisely determine the EC<sub>50</sub> values (11 concentrations in total). CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Alfa Aesar GmbH®; Karlsruhe, Germany) was used as a positive control with concentrations ranging from 20 to 100 µg L<sup>-1</sup> (5 concentrations) according to the AFNOR procedure (AFNOR, 2009).

### 5.2.3 Metamorphosis bioassay and experimental design

The aim of this endpoint was to assess the metamorphosis rate of pediveliger larvae (ready for metamorphosis) exposed to herbicides. These pediveliger larvae (21 days old) were kindly provided by the SATMAR (Société ATLantique de MARiculture) hatchery (Barfleur, France). Larvae were exposed in multiwell plates (12-wells, NUNC®; Penfield, New York, USA) in a final volume of 1.5 mL natural sterilised seawater (0.22 µm, Steritop® Millipore). Larval density was set between 50 and 80 larvae per well. To promote metamorphosis, epinephrine (Sigma Aldrich®) was added at a final concentration of 10<sup>-4</sup> M (Coon et Bonar, 1987). Experiments were conducted for 24 h at 22°C without feeding, aeration or light. After 24 h, exposed larvae were observed using an inverted binocular microscope at 100x magnification (Leica® DM IRB) to count dead larvae that exhibited tissue degradations and/or no movement. Following this first count, larvae were fixed using an 8% formalin solution. The metamorphosis rate was evaluated by counting metamorphosed versus non-metamorphosed larvae. A larva was considered metamorphosed when it presented an obvious loss of its velum, new shell growth and well-developed gills (Mottier *et al.*, 2013). Dead larvae were very rarely observed, and metamorphosis rates were thus calculated by considering the percentages of non-metamorphosed versus metamorphosed ones. The results of the metamorphosis test in exposed organisms were expressed as net percentages of metamorphosis, NPM<sub>e</sub> (adjusted for the controls) (± SEM) (see Mottier *et al.*, 2013). Experiments were performed at least three times, and for each experiment, all herbicide concentrations were tested at least in triplicate. As for the embryotoxicity tests, the broad ranges of concentrations (between 0.1 and 100,000 µg L<sup>-1</sup>) were tightened, from 10,000 µg L<sup>-1</sup> for MCCP and MCPP-P (3 additional concentrations) and from 1,000 to 10,000 µg L<sup>-1</sup> for 2-MCP (8 additional concentrations).

### 5.2.4 Statistical analyses

Data about the chemical analyses at T0 *versus* T36h (embryotoxicity) or T24h (metamorphosis) were statistically compared using non-parametric Mann-Whitney tests. Because the metamorphosis data did not meet the assumption of normality even with various transformations, they were analysed with a Kruskal & Wallis non-parametric test. Comparisons between concentrations were then performed with a modified Student Newman Keuls for non-parametric data (Scherrer, 1984). Embryotoxicity data were normalised if needed (arc-sinus transformation for MCPP data), and potential diffe-



rences were tested using one-way ANOVAs. Differences among concentrations were analysed with Student Newman Keuls tests. The statistical analyses were performed using STATISTICA 8.0 software (Statsoft®, Tulsa, OK, USA). EC<sub>10</sub> and EC<sub>50</sub> values were computed with non-linear regressions (Hill equation) using Excel® macro REGTOX (Vindimian, 2012).

## 5.3 Results

### 5.3.1 Analyses of the tested molecules

At the beginning of both types of experiments (T0), the measured concentrations were slightly lower than the nominal ones except for the embryotoxicity tests at 0.1 and 10,000 µg L<sup>-1</sup> of MCPP (0.1155 and 10,490 µg L<sup>-1</sup>, respectively) (Table 5.1). Nevertheless, the differences were generally not important and reached maxima of 20.6% and 25.35% at 100 µg L<sup>-1</sup> of MCCP-P for the embryotoxicity test and metamorphosis assay, respectively. The differences between nominal and measured concentrations did not appear to depend on the endpoint (embryotoxicity versus metamorphosis) despite the two types of experimental design. For both tests, the measured concentrations at T36h (embryotoxicity) or T24h (metamorphosis) did not differ significantly from those recorded at T0 (Mann-Whitney tests, 0.24 < p < 1) (Table 5.1). Consequently, it could be considered that organisms were exposed to constant concentrations during the whole experiments.

TABLE 5.1 – Pesticides concentrations (mean values in µg L<sup>-1</sup> ± SEM) measured for both endpoints at the beginning of the experiment and after 24h or 36h of exposure to MCPP and MCCP-P. (NC= Nominal Concentrations, MC=Measured Concentrations, % = percentage of differences between NC and MC)

	Embryotoxicity					Metamorphosis rate				
	T0h			T36h		T0h		T24h		
	NC	MC	%	MC	%	MC	%	MC	%	
Mecoprop (µg L <sup>-1</sup> )	0.1	0.115 ± 0.005	15.5	0.099 ± 0.006	1.25	0.098 ± 0.009	2.25	0.105 ± 0.012	5.25	
	100	89.85 ± 10.54	10.15	104.65 ± 0.92	4.65	97.7 ± 4.24	2.3	111.15 ± 5.59	11.15	
	10,000	10,490 ± 975.81	4.9	9020 ± 254.56	9.8	9940 ± 509.12	0.6	9370 ± 947.52	6.3	
Mecoprop-p (µg L <sup>-1</sup> )	0.1	0.10 ± 0.01	2	0.101 ± 0.01	1.25	0.089 ± 0.01	11.5	0.084 ± 0.01	15.75	
	100	79.4 ± 4.1	20.6	95.1 ± 7.07	4.9	74.65 ± 1.91	25.35	84.9 ± 5.66	15.1	
	10,000	8760 ± 820.24	12.4	10,380 ± 282.84	3.8	8310 ± 240.42	16.9	7874 ± 545.89	21.26	

### 5.3.2 Embryotoxic effects of herbicides

All of the assays performed could be considered valid because they met the requirements of the AFNOR standardised procedure (2009). Fecundation levels were high, and the raw rates of normal larvae in controls were up to 80% for all of the experi-

ments (from  $80.61\% \pm 1.14$  to  $87.75\% \pm 2.36$ ). Finally, the effects of the control contaminant ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) were in accordance with the expected dose-response curves, and  $\text{EC}_{50}$  ranged between 6 and  $16 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  regardless of the experiment. The three tested contaminants exhibited toxic effects on embryo-larval development. The 2-MCP contaminant was revealed to be the most toxic, with an  $\text{EC}_{50}$  of  $10,810.22 \mu\text{g L}^{-1}$ , whereas those recorded for MCPP and MCPP-P reached  $42,553.55 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $78,853.13$ , respectively (Table 5.2). The  $\text{NPN}_e$  values were significantly affected from  $10,000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $68.25\%; \pm 6.12$ );  $40,000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $52.68\%; \pm 12.07$ ) and  $80,000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $43.83\%; \pm 19.8$ ) for 2-MCP, MCPP and MCPP-P, respectively (Figs. 5.1 A, B, C) ( $\text{ANOVAs} < 0.05$ ;  $\text{SNKs} < 0.05$ ). Furthermore, among the three contaminants, only 2-MCP and MCPP led to 0% of normal development for the concentrations of  $20,000 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $100,000 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively, whereas  $25.69\% (\pm 11.55)$  of normal larvae were observed at the highest concentration of MCPP-P ( $100,000 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Whatever the tested chemical, results related to the types of abnormalities indicated that late arrested development was the predominant abnormality at high doses of contaminants ( $100,000 \mu\text{g L}^{-1}$  : 100% of embryos in MCPP ;  $98.34\%$  in 2-MCP and  $56.32\%$  in MCPP-P) (Fig. 5.2). Moreover, MCPP appeared to specifically affect shell formation, with a proportion of shell abnormality reaching  $29.75\%$ ,  $44.08\%$  and  $44.36\%$  at concentrations of  $40,000$ ,  $60,000$  and  $80,000 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively (Fig. 5.2A). The shell deformations are illustrated in Fig. 5.3. Such a response could not be observed for MCPP-P or 2-MCP, which were associated with maximum rates of shell abnormality of  $20.19\%$  and  $15.12\%$ , respectively, and followed the same pattern with a concentration shift (Figs. 5.2 B, C).

TABLE 5.2 – Ecotoxicological parameters calculated for the embryotoxicity tests (rates of abnormalities in D-shaped larvae) and the rates of pediveliger larvae metamorphosis after 48 h exposures to 3 herbicide substances : Mecoprop (MCPP), Mecoprop-P (MCPP-P) and 4-Chloro-2-methylphenol (2-MCP). Ecotoxicological parameters are given for nominal and corrected concentration.  $\text{ECX}$  = effective concentration (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) which induces an effect on X% of the population (10 or 50%). na= non-available data

Endpoints	Parameters	MCPP	MCPP-P	2-MCP
Abnormality rates in D-shaped larvae (nominal concentrations)	$\text{EC}_{10}$	32,178.29	50,489.47	8873.72
	$\text{EC}_{50}$	42,553.55	78,853.12	10,810.22
Abnormality rates in D-shaped larvae (measured concentrations)	$\text{EC}_{10}$	26,655.49	51,361.05	na
	$\text{EC}_{50}$	34,479.17	80,951.71	na
Metamorphosis rates of pediveliger larvae (nominal concentrations)	$\text{EC}_{10}$	> 100,000	> 100,000	5603.4
	$\text{EC}_{50}$	> 100,000	> 100,000	7199.79
Metamorphosis rates of pediveliger larvae (measured concentrations)	$\text{EC}_{10}$	> 100,000	> 100,000	na
	$\text{EC}_{50}$	> 100,000	> 100,000	na

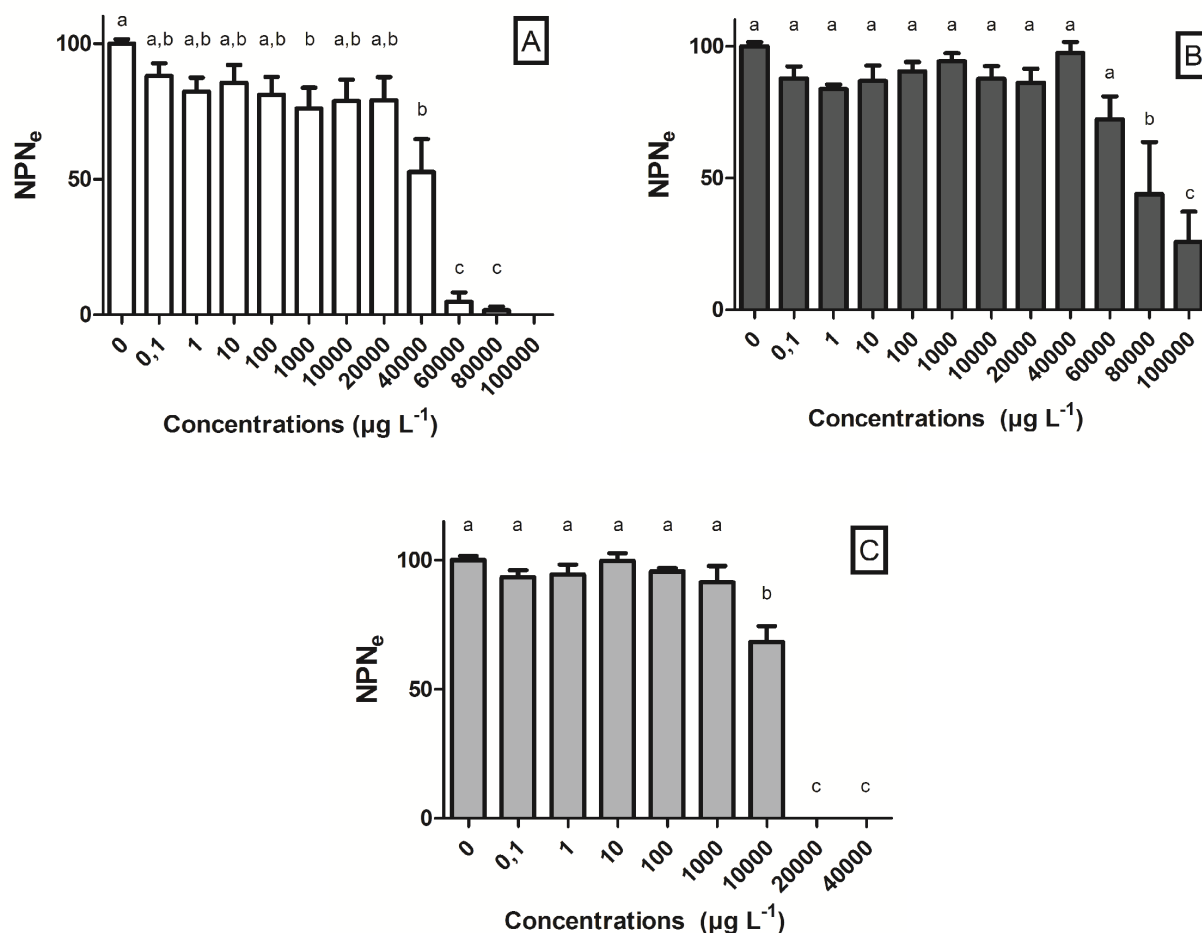


FIGURE 5.1 – Net percentages of normal development (NPN<sub>e</sub>) ( $\pm$  SEM) in *C. gigas* embryo-larvae observed after 36 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.10 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for mecoprop (MCP) (A), mecoprop-p (MCP-P) (B) and 2-methyl-4-chlorophenol (2-MCP) (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different.

### 5.3.3 Effects of herbicides on larval metamorphosis

With regard to all experiments, the raw mean metamorphosis rate was 96.93% ( $\pm$  0.72) for the controls. MCP had no effect on the process of metamorphosis. In fact, metamorphosis rates (NPM<sub>e</sub>) recorded for all of the tested concentrations of this herbicide ranged from 89.36% ( $\pm$  3.24; 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) to 101.17% ( $\pm$  0.566; 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and no significant differences were observed (Kruskall & Wallis,  $p > 0.05$ ) (Fig. 5.4A). The effects of MCP-P on metamorphosis were also extremely limited. Rates of metamorphosis were up to 96.46% from 0  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 75,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and a slight but significant decrease was recorded at the highest concentration of 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Kruskall & Wallis,  $p < 0.05$ ; SNK,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5.4A). As the two herbicide molecules were practically non-toxic for the tested range of concentrations, it was thus not possible to compute EC<sub>x</sub> values. Compared to the parent compounds, 2-MCP was revealed to be more toxic to

the metamorphosis of *C. gigas* larvae. The  $NPM_e$  recorded for the control did not differ significantly from those calculated for the concentrations from  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $4000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $NPM_e$  from 95.67% to 100.40%) (Fig. 5.4B). From the concentration of  $6000 \mu\text{g L}^{-1}$ , the metamorphosis of larvae was significantly affected ( $88.04\% \pm 2.133$ ) (Kruskal & Wallis,  $p < 0.01$ ; SNK,  $p < 0.05$ ), and a sharp decrease was recorded from  $6500 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $70.54\% \pm 7.41$ ) to  $10,000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $4.01\% \pm 1.04$ ). The  $EC_{10}$  and  $EC_{50}$  computed with non-linear regressions applied to the data were  $5603.4 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $7199.79 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively (Table 5.2).

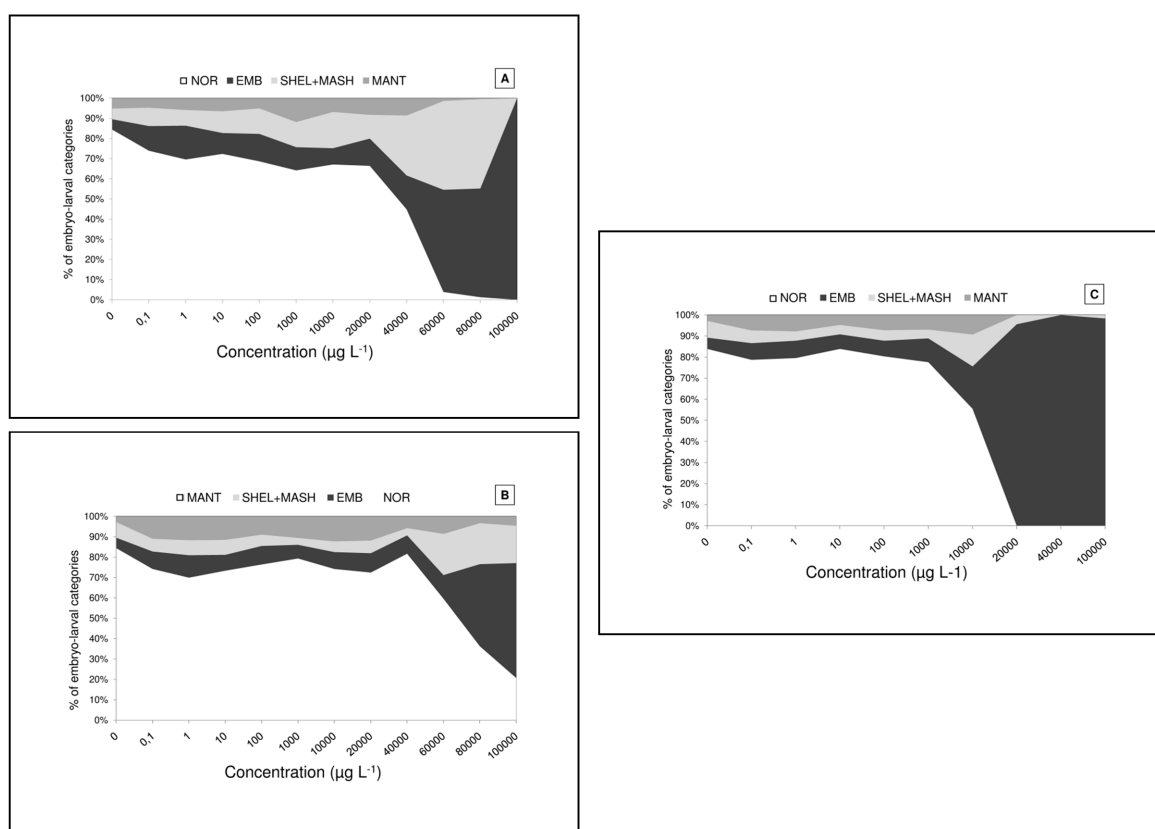


FIGURE 5.2 – Occurrence of the various types of abnormalities affecting embryo-larval development in *C. gigas* after 36 h of herbicide exposure in relation to the concentrations of three chemicals : mecoprop (MCP) (A), mecoprop-p (MCP-P) (B) and 2-methyl-4-chlorophenol (2-MCP) (C). NOR : normal D-shaped larvae; EMB : "old embryo"; SHEL+MASH : D-shaped larvae exhibiting shell and/or hinge abnormalities (with/without additional mantle abnormality); MANT : D-shaped larvae with a hypertrophied mantle).

## 5.4 Discussion

### 5.4.1 Concentrations of chemicals and their dynamics

For both endpoints, chemical analyses were performed to assess the potential changes in MCP and MCP-P concentrations during the experiments. The measured concentrations at the end of the experiment did not differ significantly from those recorded at the beginning of the assay. Unfortunately, 2-MCP could not be measured in this study and data about the features (e.g. hydrolysis) of pesticides including 2-MCP generally refer to freshwater environments (surface freshwaters showing different pH values) and not to seawaters. Nevertheless, it can be hypothesised that the fate of 2-MCP in our experimental structures did not differ meaningfully from those of MCP and MCP-P. In fact, like both of its parent compounds, 2-MCP is highly water-soluble ; data about its half-life are scarce, but hydrolysis (and photolysis) are estimated to be negligible (OECD, 2013). In the same experimental structures as those used in the current study, Mottier et al. (2013) showed that the concentrations of glyphosate and AMPA did not change during embryotoxicity and metamorphosis bioassays, although they are reported as non-persistent molecules. Because 2-MCP belongs to the herbicide family of chlorophenols, which are well known for being difficult to remove from the environment and exhibiting a long half-life in water (Pera-Titus *et al.*, 2004), it can be assumed that these concentrations were also constant during the whole experiments. For all three compounds, significant hydrolysis could thus be excluded, and photolysis could not occur because the experiments were carried out in the dark. MCP and MCP-P analyses were also conducted to verify the nominal concentrations by comparing them with measured ones. The differences were rather low, with the maximum differences observed for pediveliger larvae exposed to MCP-P at T0 and T24h (17-18% in average) ; intermediate percentages (10-11%) were calculated for embryotoxicity at T0 for both herbicides, and the other differences did not exceed 7% (Table 5.1). The differences between nominal and measured concentrations appeared to be globally independent of both the molecules and the endpoints tested and were most likely due to variation in handling. To take these differences into account, the values of EC<sub>50</sub> in organisms exposed to MCP and MCP-P were recalculated using measured concentrations, but the values of this ecotoxicological parameter were within the same order of magnitude and did not change the conclusions.

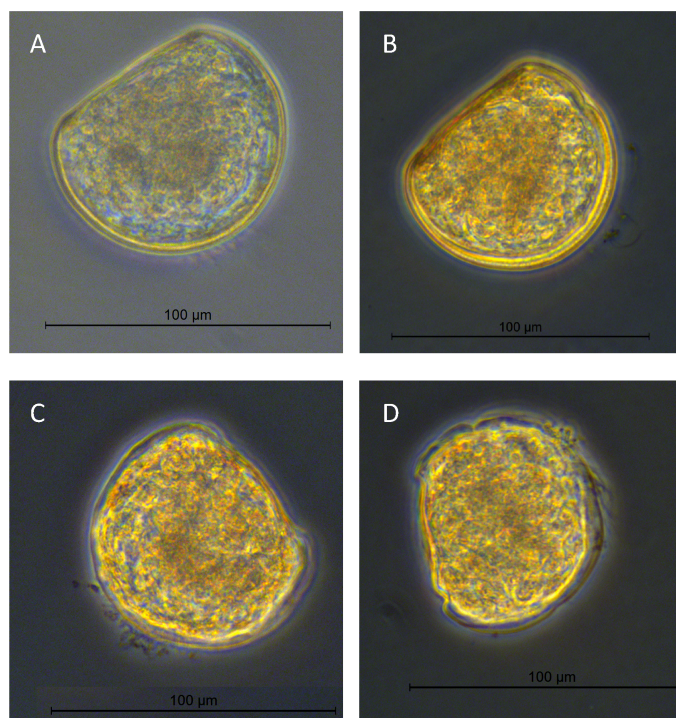


FIGURE 5.3 – Light microscopy images (400x) showing (A) a normal D-shaped veliger and (B, C, D) D-shaped veligers showing increasingly severe shell abnormalities.

#### 5.4.2 Effects of mecoprop and herbicide mixtures including mecoprop on aquatic animals

With  $EC_{50}$  values of 79-81 mg L<sup>-1</sup> and 34-43 mg L<sup>-1</sup> (Table 5.2), MCCP-P and MCCP can be classified as "slightly toxic" (US EPA Toxicity Classification) or "harmful" (European Toxicity Classification), both of those categories characterised by  $EC_{50}$  values ranging from 10 to 100 mg L<sup>-1</sup> (Giesy *et al.*, 2000). In the case of 2-MCP, the calculated  $EC_{50}$  value was lower (11 mg L<sup>-1</sup>), which placed this degradation compound in the same category but closer to the category of "moderately toxic" (US EPA Toxicity Classification) or "toxic" (European Toxicity Classification) (1 mg L<sup>-1</sup> <  $EC_{50}$  < 10 mg L<sup>-1</sup>). It is notable that the glyphosate by-product (AMPA) was less toxic for oyster larvae than the parent molecule (Mottier *et al.*, 2013), whereas 2-MCP was revealed to be more toxic than both MCCP and MCCP-P. Such a conclusion should be highlighted because European regulation primarily concerns active substances, but in aquatic environments, the degradation products of pesticides have also to be considered, especially when they are more toxic than the active molecules or commercial formulations.

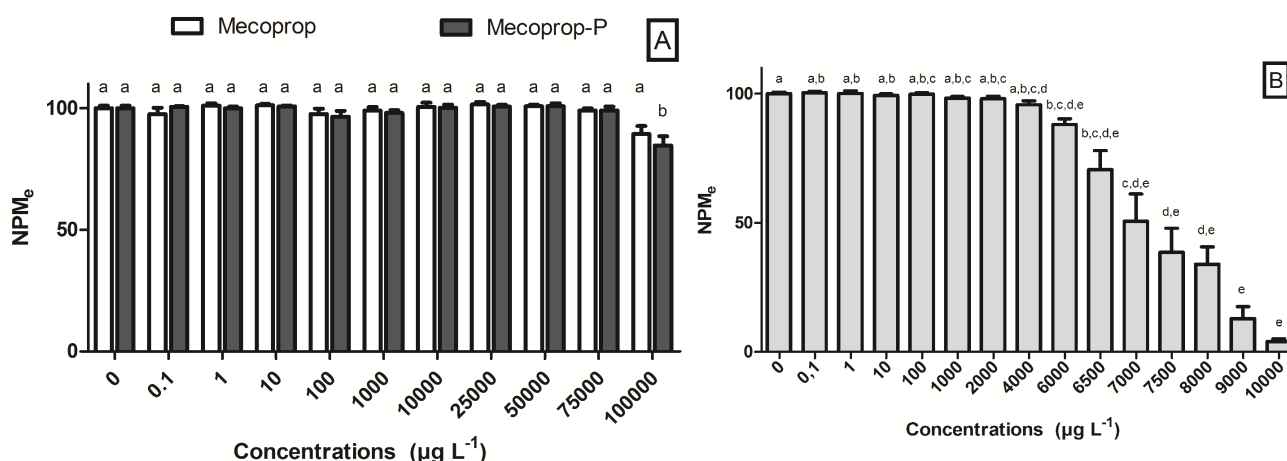


FIGURE 5.4 – Net percentages of metamorphosed larvae ( $\text{NPM}_e$ ) ( $\pm$  SEM) observed after 24 h of exposure to herbicides at concentrations ranging from 0.1 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate and AMPA (A) or 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for mecoprop (MCCP) and mecoprop-p (MCCP-P) (A) and 2-methyl-4-chlorophenol (2-MCP) (B). The concentrations that do not share a letter are significantly different.

For target organisms (cereal crops, grasslands and lawns), MCCP-P exhibits a higher herbicide activity because it is composed essentially of the active (R)-(+ enantiomer, whereas MCCP, which includes both enantiomers, is a less effective herbicide and consequently has been progressively replaced by MCCP-P from the 1980s. By contrast, in non-target organisms such as oyster larvae, exposure to MCCP led to the calculation of a lower  $\text{EC}_{50}$  value and thus was revealed to be more toxic than MCCP-P; this result suggests a greater impact of the (S)-(-) isomer than the (R)-(+) enantiomer on *C. gigas* embryo-larval stages. These herbicides act on target organisms by disturbing the regulation of auxin production, but that type of phytohormone does not exist in animals, including oysters. Other modes of action thus have to be considered, but the identification of such an alternative mode is difficult, notably because little is known about herbicides' toxicity on non-target organisms or the precise mechanisms occurring during embryo-larval development in *C. gigas*. In the current study, the herbicides induced serious damages in the young embryos preventing them from developing from different thresholds according to molecules (10,000 – 60,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). At the highest concentration (100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), the primary (for MCCP-P) or the only (for MCCP and 2-MCP) abnormality type observed corresponded to arrested development at the embryo stage, which is the most severe type of damage, as individuals failed to reach the D-larva stage. The second most severe abnormality appeared to concern shell formation; relatively high rates of shell deformities (including mantle abnormalities) were recorded for concentrations from 60,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 40,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for MCCP-P and MCCP, respecti-

vely. In fact, rates of shell abnormalities could exceed 20% and peaked at 44.31% for the MCPP concentration of 80,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Such high rates were not calculated for *C. gigas* exposed to glyphosate-based herbicides because the frequency of shell abnormalities was generally low and reached maxima from 5.96% (0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Roundup Express®) to 9.78% (0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  of AMPA) (Mottier et al., 2013). Moreover, the larvae exposed to glyphosate-based herbicides exhibited little shell deformation compared to the larvae submitted to mecoprop and especially to MCPP (Fig. 5.3); Mottier et al. (2013) wondered whether shell abnormalities (showing different degrees of severity) were viable or lethal. In the current study, the shell deformations observed were generally more severe, and it can be assumed that they might not allow the survival of the affected larvae. Although 2-MCP did not particularly induce shell abnormalities (maximum of 9.27% for the concentration of 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), MCPP (and to lesser extent MCPP-P) at high concentrations (from 40,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) appeared to act by disturbing shell formation. Nice and his collaborators (2000) have reported larval deformities in *C. gigas* larvae exposed to 4-nonylphenol, but these malformations appeared to be less drastic and essentially concerned the hinge, which was convex instead of right. These authors (2000) suggested a chemical interaction with shell development through the calcium metabolism of the larvae; i.e., calcium being possibly "mobilised for use elsewhere within the organism". Future works are needed to accurately investigate the biomineralisation processes in *C. gigas* larvae exposed to MCPP. These studies would be especially useful because there are few data about the effects of pollutants on the shell of marine molluscs, except the impact of tributyltin on the shell of adult individuals (e.g. Meng et al., 2005).

With regard to embryotoxicity, the three tested substances could be classified according an increasing gradient of toxicity as follows : MCPP-P, MCPP and 2-MCP. For the metamorphosis test, the degradation product was also revealed to be more toxic than MCPP and MCPP-P. For the two parent molecules, the rate of metamorphosis remained high even at the highest concentration (100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and it was thus impossible to compute  $\text{EC}_{50}$  values. However, at this highest concentration, the metamorphosis rate of pediveliger larvae exposed to MCPP-P (but not to MCPP) was slightly but significantly lower compared to the other concentrations. To definitely conclude about a possible difference in the toxicity of MCPP *vs.* MCPP-P to the success of metamorphosis in *C. gigas*, further experiments (including concentrations higher than 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) would be necessary but not very useful, as both substances can be considered "practically nontoxic" according to the US EPA Toxicity Classifications (Giesy et al.,



2000). Compared to glyphosate and its by-product (AMPA) (Mottier et al., 2013), MCPP and MCPP-P exhibited similar results with EC<sub>50</sub> values higher than 100,000 µg L<sup>-1</sup>. By contrast, the EC<sub>50</sub> value computed for pediveliger larvae exposed to 2-MCP was 7199 µg L<sup>-1</sup>. This value was slightly higher but within the same order of magnitude as those calculated for Roundup Express® (6366 µg L<sup>-1</sup>) and Roundup Allées et Terrasses® (6060 µg L<sup>-1</sup>) by Mottier and his collaborators (2013). These three substances can be qualified as "moderately toxic" (US EPA Toxicity Classification) or "toxic" (European Toxicity Classification) (Giesy et al., 2000). Unfortunately, the mode of action of 2-MCP (and that of its parent compounds) on metamorphosis processes still remains unknown. For the metamorphosis test, the protocol involves the addition of 10<sup>-4</sup> M epinephrine to induce metamorphosis in larvae placed in multiwall plates (which do not offer an optimal surface for larvae settlement). According to the present results for 2-MCP, it can be hypothesised that this molecule interacts negatively with epinephrine. In the presence of 2-MCP, pediveliger larvae did not die or exhibit apparent problems, but they were very active and swam and moved constantly.

His and Seaman (1993) compared the toxicity of 12 pesticides, including mecoprop, to the survival and growth of *C. gigas* embryo-larval stages from fertilisation to nine days (veliger stage). They concluded that there was a lethal effect of mecoprop on 50% of the studied larval population after nine days of exposure to a mecoprop concentration of 4200 µg L<sup>-1</sup>. This relatively low value indicated a higher toxicity of mecoprop compared to the EC<sub>50</sub> values found in the current study for embryo-larval development and metamorphosis. His and Seaman's results are especially interesting because they demonstrated that longer exposures (9 days) could prove more injurious to oyster larvae than short exposures (24 or 36 h). Moreover, the LC<sub>50</sub> recorded by His and Seaman (1993) indicated that mecoprop was less toxic than isoproturon or lindane but more toxic than five other pesticides, including two insecticides and one molluscicide that are generally considered more toxic to animal organisms (parathion methyl, carbofuran and metaldehyde). With regards to shell growth for nine days, His and Seaman (1993) reported a 10% height reduction in response to exposure to a rather low concentration : 130 µg L<sup>-1</sup>. In comparison with larval mortality, this endpoint indicated different results, as only one insecticide (parathion methyl) appeared to be more toxic than mecoprop, one molecule (lindane) produced the same EC<sub>50</sub> value and eight pesticides were less toxic according to this biomarker. Moreover, and quite surprisingly for a pesticide, His and Seaman (1993) suggested a hormesis effect at the lowest tested concentration (50 µg L<sup>-1</sup>), for which slight additional growth was observed. Aside

from this positive effect, the authors recorded inhibition of shell growth from 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; this effect on the oyster shell can be linked with the shell deformities reported in the current study. In Pectinidae, specifically *Pecten maximus*, Larvor-Cario and her collaborators (2000) have demonstrated modifications in shell calcareous structures; these authors suggested a link with salinity decreases and also with two pesticides: diuron and mecoprop. In estuaries and coastal ecosystems, organisms are generally exposed to a mixture of various pollutants. Moreover, the effects of these contaminants are dependent on other abiotic parameters such as salinity or temperature. For example, soft-shell clams (*Mya arenaria*) exposed to a pesticide mixture composed of mecoprop, 2,4-D and dicamba and acclimated to 7°C versus 18°C exhibited different patterns of physiological responses (Greco *et al.*, 2011); the authors concluded that increased temperature altered the ability of the sentinel species to respond to pesticide exposures. Using transcriptomic approaches, a significant effect of an herbicide mixture including mecoprop has been demonstrated on the liver in the European flounder *Platichthys flesus* when exposed for 62 days; the methionine level, lipid transport and metabolism, immunity and respiratory chain were particularly affected (Evrard *et al.*, 2010). Finally, mixtures of pesticides can also have an indirect positive effect on oyster populations by acting on their pathogens, such as the protozoan *Perkinsus marinus*, as demonstrated by Bushak and his collaborators (2007). During *in vitro* experiments, the proliferation of *P. marinus* was significantly inhibited by an herbicide mixture including 10.6% mecoprop (Weed-B-Gone®), but not at or below the manufacturer's recommended application rate.

#### 5.4.3 Effects of various contaminants on the embryo-larval development in *C. gigas*

Comparisons between polluted sites or between pollutants are especially relevant if the same species is considered. The embryotoxicity of five types of pesticides have already been assessed in *C. gigas*: an insecticide (endosulfan; Wessel *et al.*, 2007); a molluscicide (methiocarb; (His *et al.*, 1999)); a fungicide (Opus®: epoxiconazole; (Amara, 2012)), an algaecide (Irgarol® substituting TBT in anti-fouling paints; (Mai *et al.*, 2012)); and a higher number of herbicides: triazine herbicides (atrazine and simazine), dinoterb (Robert *et al.*, 1986), metolachlor (Mai *et al.*, 2012), diuron (Akcha *et al.*, 2012) and finally glyphosate-based herbicides (His *et al.*, 1999; Akcha *et al.*, 2012; Mottier *et al.*, 2013). The embryotoxicity test applied to *C. gigas* has also been used to estimate the effect of metals (Martin *et al.*, 1981; His *et al.*, 1999; Mamindy-Pajany *et al.*, 2013), alkylphenols (Nice *et al.*, 2000), nonylphenols (Amara, 2012), PAHs (Lyons *et al.*,

2002; Wessel *et al.*, 2007), endocrine disruptors (Wessel *et al.*, 2007), fungal peptides (Poirier *et al.*, 2007); and to test the effects of polluted sediments (Geffard *et al.*, 2002; Cachot *et al.*, 2006). A summary of the toxicity levels of these various compounds is given in Table 5.3. This table does not include data on copper ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), as that metal is generally used as a positive control, and  $\text{EC}_{50}$  ranges from  $8.47\text{--}12.43 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  (Mottier *et al.*, 2013) to  $22\text{--}40 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  (Poirier *et al.*, 2007). Some of these studies have focused on relatively narrow concentration ranges, and the  $\text{EC}_{50}$  could thus not be determined, whereas we tested a wide range of herbicide concentrations including both low ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and very high (up to  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) concentrations to compute  $\text{EC}_{50}$  values. Nevertheless, MCCP-P and MCCP appeared to be less toxic than all of the pesticides previously tested with the exception of being similarly toxic to the degradation product of glyphosate (AMPA; Mottier *et al.*, 2013). Compared to the other compound families (metals, PAHs, by-products of adjuvants including nonylphenol, fungal peptides), the three herbicide molecules tested in the current study appeared to be weakly toxic to embryo-larval development in *C. gigas* (Table 5.3). Few data concern the modes of action of contaminants on embryo-larval stages. Poirier and her collaborators (2007) have reported that fungal peptides (peptaibols detected in marine sediments and mussels) exhibit a broad spectrum of bioactivity, and larval abnormalities could be the result of a particular chemical interference of peptaibols with embryolarval development in relation to their membrane interaction properties. The chloroacetanilide herbicide metalochlor might affect the protein synthesis of oyster embryos and cause developmental defects and DNA damage (Mai *et al.*, 2012). A significant positive correlation was demonstrated between embryotoxicity and genotoxicity (assessed by the comet assay) in *C. gigas*, particularly when exposed to benzo[a]pyrene (Wessel *et al.*, 2007). These authors (2007) highlighted the ability of the oyster to biotransform the tested xenobiotics from early life stages and the bioactivation resulting in the induction of an oxidative stress involved in the measured oxidative DNA damages.

#### 5.4.4 Comparison between different endpoints

When the  $\text{EC}_{50}$  values of both endpoints are compared, it appears that embryos and D-shaped larvae are more sensitive than pediveliger larvae to MCCP and MCCP-P (present study) and to glyphosate-based herbicides (Mottier *et al.*, 2013). The sensitivity of the very early stages can be linked to the very important morphological and anatomical changes occurring during embryo-larval development (Gilbert, 2003); many changes also occur during metamorphosis in *C. gigas* (Baker and Mann, 1994),

but most likely not to the same extent. Quite surprisingly, the mecoprop degradation product (2-MCP) appeared to be more toxic to pediveliger larvae ( $EC_{50}$  of 7199  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) than to embryos and D-shaped larvae ( $EC_{50}$  of 10,810  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). In contrast with the embryotoxicity test, the metamorphosis assay has rarely been employed as an ecotoxicological endpoint in aquatic organisms. His and his collaborators (1997a) used this endpoint applied to *C. gigas* to assess the toxicity of sediments polluted by HAPs, and they concluded that metamorphosis failure was a valid bioindicator of general toxicity. Moreover, metamorphosis is a critical period, especially crucial in terms of the recruitment and sustainability of wild stocks. In this context, metamorphosis of the Pacific oyster can be recommended in marine ecotoxicology ; moreover, this endpoint can sometimes be more sensitive than the embryotoxicity test, which is especially known for its high sensitivity. Comparisons of the current results with different endpoints recorded in ecotoxicological model species are difficult, but *C. gigas* early stages appeared to be relatively sensitive, especially for MCPP and MCPP-P. In fact, the results for oyster embryo-larval stages showed lower  $EC_{50}$  values than those indicated for fish lethality, for a *Daphnia magna* immobilisation test (PPDB, 2013) or for lethality to the copepod *Nitocra spinipes* (Linden *et al.*, 1979). However, both the  $EC_{10}$  and  $EC_{50}$  values computed in the current study are above the Predictive No Effect Concentrations (PNEC) proposed for saltwater : 18  $\mu\text{g L}^{-1}$  (long-term) and 187  $\mu\text{g L}^{-1}$  (short-term) (Whitthhouse et UK Environment Agency, 2010). Finally, the three tested molecules could significantly affect embryo-larval development and metamorphosis but at concentrations far higher than those recorded in aquatic environments (maximum values of a few tens of  $\mu\text{g L}^{-1}$  ; Fletcher *et al.*, 1995 ; Wittmer *et al.*, 2010).

TABLE 5.3 – Ecotoxicological data obtained from embryotoxicity test in *Crassostrea gigas*.

Chemical	Chemical type	Ecotoxicological parameter	Value	Authors
Arsenic	Metal	EC <sub>50</sub> 48h	326 µg L <sup>-1</sup>	Martin et al., (1981)
Chrome (VI)	Metal	EC <sub>50</sub> 48h	4538 µg L <sup>-1</sup>	
Lead	Metal	EC <sub>50</sub> 48h	758 µg L <sup>-1</sup>	
Nickel	Metal	EC <sub>50</sub> 48h	349 µg L <sup>-1</sup>	
Selenium	Metal	EC <sub>50</sub> 48h	not reached > 10,000 µg L <sup>-1</sup>	
Zinc	Metal	EC <sub>50</sub> 48h	119 µg L <sup>-1</sup>	
Atrazine-simazine	Triazine herbicides	NOEC 24h	1000 µg L <sup>-1</sup>	Robert et al., (1986)
Mercury chloride	Metal	EC <sub>50</sub> 24h	12.3 µg L <sup>-1</sup>	His et al., (1999)
Mercaptodimethur	Carbamate pesticide	EC <sub>50</sub> 24h	not reached > 200 µg L <sup>-1</sup>	
Glyphosate	Phosphonoglycine herbicide	EC <sub>50</sub> 24h	not reached > 200 µg L <sup>-1</sup>	
Dinoterbe	Dinitrophenol herbicide	EC <sub>50</sub> 24h	72.2 µg L <sup>-1</sup>	
4-nonylphenol	Alkylphenol	NOEC 48h	10 µg L <sup>-1</sup>	Nice et al., (2000)
Benzo [a] pyrene	PAH	EC <sub>50</sub> 48h	2.5 µg L <sup>-1</sup> < EC <sub>10</sub> 25 µg L <sup>-1</sup>	Lyons et al., (2002)
Pyrene	PAH	EC <sub>50</sub> 48h	≈ 100 µg L <sup>-1</sup>	
Alamethicins	Fungal peptides	EC <sub>50</sub> 22h	31 nM	Poirier et al., (2007)
Long-chain peptaibols	Fungal peptides	EC <sub>50</sub> 22h	10 nM	
Short-sequence peptaibols	Fungal peptides	EC <sub>50</sub> 22h	64 nM	
Benzo [a] pyrene	PAH	LOEC 20h	0.05 µg L <sup>-1</sup>	Wessel et al., (2007)
17 $\alpha$ -ethinylestradiol	Synthetic hormone	EC <sub>50</sub> 20h	not reached > 0.5 µg L <sup>-1</sup>	
Endosulfan	Organochlorine pesticide	NOEC 20h	61.04 µg L <sup>-1</sup>	
Diuron	Phenylurea herbicide	EC <sub>50</sub> 24h	< 0.05 µg L <sup>-1</sup>	Akcha et al., (2012)
Glyphosate	Phosphonoglycine herbicide	NOEC 24h	2.5 µg L <sup>-1</sup>	
Roundup Express®	Herbicide commercial formulation	EC <sub>50</sub> 24h	not reached > 5 µg L <sup>-1</sup>	Amara, (2012)
Opus®	Epoxinocazole	EC <sub>50</sub> 24h	32.2 µg L <sup>-1</sup>	
Nonyphenol	Alkylphenol	EC <sub>50</sub> 24h	20.9 µg L <sup>-1</sup>	Mai et al., (2012)
Irgarol	Triazine herbicide	NOEC 24h	0.001 µg L <sup>-1</sup>	
Metolachlor	Chloroacetamide herbicide	NOEC 24h	0.001 µg L <sup>-1</sup>	
Cadmium chloride	Metal	EC <sub>50</sub> 24h	212.3 µg L <sup>-1</sup>	
Arsenic (III)	Metal	EC <sub>50</sub> 24h	1370 µg L <sup>-1</sup>	Mamindy-Pajany et al., (2013)
Arsenic (V)	Metal	EC <sub>50</sub> 24h	920 µg L <sup>-1</sup>	
Glyphosate	Phosphonoglycine herbicide	EC <sub>50</sub> 48h	28,315 µg L <sup>-1</sup>	Mottier et al., (2013)
Amino methyl phosphonique acid	Biodegradation compound	EC <sub>50</sub> 48h	40,617 µg L <sup>-1</sup>	
Roundup Express®	Herbicide commercial formulation	EC <sub>50</sub> 48h	1133 µg L <sup>-1</sup>	
Roundup Allées et Terrasses®	Herbicide commercial formulation	EC <sub>50</sub> 48h	1672 µg L <sup>-1</sup>	

## 5.5 Conclusion

Mecoprop formulations (MCP and MCP-P) and their degradation compound (2-MCP) were found to be "slightly toxic" or "harmful" to oyster embryo-larval development according to the US EPA Classification and the European Toxicity Classification, respectively. Considering these classifications, the parent molecules could be considered "practically nontoxic" in terms of metamorphosis mechanisms, whereas 2-MCP was classified as "moderately toxic" (or "toxic"). Nevertheless, the  $EC_{50}$  values allowing these classifications were much higher than the concentrations predicted or measured in coastal environments. Furthermore, the two enantiomers acted differently on non-target organisms (MCP more toxic to embryo-larval development) compared to target organisms (MCP-P exhibiting the herbicidal activity). The herbicides' toxicity appeared to depend not only on the molecule but also on the chirality of this molecule. For both endpoints, 2-MCP appeared to be more toxic than MCP and MCP-P, and a quite surprising result was that the by-product was more toxic to pediveliger larvae (21 days old) compared to D-shaped larvae (36 h old). In addition to active compounds and commercial formulations, it is thus important that regulations consider degradation products, which can be more harmful to the environment. The mode of action of MCP on *C. gigas* D-shaped larvae remains unknown, but in accordance with the scarce literature, this study indicated a potential effect of this molecule on shell development, with percentages of abnormal shells and a severity of shell deformities that are higher than those recorded with other molecules.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge the staff of the laboratory CNRS-INEE FRE BioMEA and all of our colleagues in the "Chronexpo scientific community". This study was supported by the Region Basse-Normandie and the European Program Interreg IVA Chronexpo supervised by Dr. Bruno Fievet from IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) of Cherbourg-Octeville. We also thank the SATMAR team, who kindly provided us pediveliger larvae.

## RAPPEL DES RESULTATS IMPORTANTS-CONCLUSION

- Selon la classification adoptée par l'EPA, les molécules testées peuvent être qualifiées de : "hautement toxique" (Genamin T-200) ; "modérément toxique" ( $R_{EX}$  et  $R_{AT}$ ) et "légèrement toxique" (glyphosate, AMPA, MCPP, MCPP-P, 2-MCP) pour les larves véligères D (36h) ainsi que "modérément toxique" ( $R_{EX}$ ,  $R_{AT}$ , Genamin T-200 et 2-MCP) et "pratiquement non toxique" (glyphosate, AMPA, MCPP, MCPP-P) pour les larves pédivéligères (21 jours).
- Cependant, les molécules étudiées ne sont pas toxiques sur les jeunes stades de *C. gigas* aux concentrations correspondant aux doses environnementales.
- Dans la "famille" du glyphosate, les formulations commerciales sont beaucoup plus toxiques que la matière active et le produit de dégradation (AMPA) et cela peut être attribué à l'adjuvant (POEA) qui se distingue par sa toxicité importante. Le produit de dégradation du mecoprop (4C2M) est significativement plus toxique que le mecoprop (quel que soit l'énantiomère considéré).
- Il importe donc que la législation sur les pesticides s'intéresse autant aux formulations commerciales, aux adjuvants et aux produits de dégradation qu'aux matières actives.
- Les larves véligères D âgées de 36h sont plus sensibles que les larves pédivéligères de 21 jours (sauf pour le 2-MCP).
- Le développement embryo-larvaire et la métamorphose constituent des phases critiques et peuvent être utilisés comme biomarqueurs pertinents en écotoxicologie (du fait notamment de leurs sensibilité et de leur facilité de mise en oeuvre). Il conviendrait néanmoins de procéder à une standardisation du test de la métamorphose.
- Bien que les modes d'action des molécules testées demeurent un large champs d'investigation, un effet sur les stades de développement précoces a été mis en évidence avec certaines molécules ( $R_{EX}$ ,  $R_{AT}$ , Genamin T-200) tandis que des effets plus tardifs sur la formation de la coquille ont été observés notamment après l'exposition au MCPP.





## **Quatrième partie**

# **Approche *in vivo* : expositions subchroniques**



## Chapitre 6

# Effets des expositions subchroniques au glyphosate, Roundup<sup>®</sup> et POEAs chez des juvéniles de *Crassostrea gigas*

### 6.1 Introduction

Les résultats obtenus dans les premiers chapitres de la thèse ont permis de mieux appréhender les effets de l'exposition aux herbicides au niveau cellulaire chez *Haliotis tuberculata* et sur les stades de développement embryon-larvaires chez *Crassostrea gigas*. Les différentes observations ont montré que l'effet des molécules testées à court terme est observé à des doses qui sont supérieures à celles généralement retrouvées dans l'environnement. Les apports diffus de contaminants tels que les pesticides peuvent affecter les zones côtières à partir de rejets des zones urbaines et/ou agricoles et les doses détectées dans les environnements côtiers sont de l'ordre de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Burgeot *et al.*, 2008). Les bivalves qui vivent dans les environnements littoraux et estuariens sont, de part leur mode de vie sessile, soumis à ces pollutions tout au long de leur vie post-métamorphose. Dans le but de comprendre l'effet de ces pollutions diffuses, les expérimentations *in vivo* doivent se rapprocher des conditions de l'environnement et s'intéresser à l'effet de faibles doses de contaminants sur les organismes pendant des périodes d'exposition aussi longues que possible.

Si les études qui s'attachent à l'effet de ces pollutions diffuses chez les mollusques et sur des temps d'exposition relativement longs sont très intéressantes d'un point de vue écologique, elles restent néanmoins peu fréquentes. Une des raisons qui peut être invoquée est la lourdeur zootechnique inhérente au maintien d'organismes filtreurs. Ces

organismes nécessitent, par exemple, un apport de nourriture important sous forme de microalgues, ce qui requiert la maîtrise des cultures algales en volumes importants. De plus, selon le type de contaminant utilisé et afin d'en limiter autant que possible les rejets, les organismes doivent être exposés de manière statique ou semi-statique et des systèmes de retraitement des eaux sont nécessairement mis en place. Le corollaire des expositions statiques est l'obligation de changements de milieu réguliers afin de maintenir une qualité d'eau la plus correcte possible et sans contamination surnuméraire (composés azotés dont ammoniacque) tout en maintenant la pression de contamination prévue dans le protocole expérimental.

Bien que peu de données soient disponibles, l'effet des expositions à divers contaminants pendant des temps relativement longs a été appréhendé par divers auteurs. Ainsi, l'effet du zinc a été étudié par Devos et ses collaborateurs (2012) chez du naissain de *C. gigas* pendant une période de 10 semaines. Ces auteurs ont montré l'intérêt d'étudier des paramètres biologiques tels que la croissance qui peut être un biomarqueur sensible et qui intègre l'ensemble des paramètres physiologiques susceptible d'être affectés par un polluant. De plus, les résultats de cette étude montrent une augmentation significative de l'expression des métallothionéines après 11 jours d'exposition pour la concentration de 33  $\mu\text{M}$  et après 52 jours d'exposition pour la concentration de 15,5  $\mu\text{M}$ . L'étude de la réponse d'huîtres (*C. virginica*) exposées en mésocosme au fipronil, insecticide de la famille des phénylpyrazoles, a été menée par Wirth *et al.* (2004) qui ont mis en évidence une augmentation significative de la longueur des individus exposés après 28 jours d'exposition. Au niveau tissulaire, des altérations histopathologiques telles que l'atrophie de la paroi des tubules de la glande digestive ont été observées par Buisson et ses collaborateurs (2008) après exposition pendant 7 jours à partir de la concentration de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diuron et de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'un mélange d'herbicides (diuron, isoproturon, bentazone et desethyl atrazine). De plus, ces auteurs rapportent une ponte partielle plus fréquentes chez les individus exposés par rapport aux huîtres témoins. D'autres études rapportent l'effet de pesticides chez des mollusques bivalves pendant des temps d'exposition de plusieurs jours. Ainsi, l'étude de Auffret et Oubella (1997) s'est intéressée à l'effet du TBT et d'un mélange de trois pesticides (atrazine, diuron et isoproturon) sur la mortalité et l'agrégation des hémocytes de *C. gigas* après 6 jours d'exposition. Les concentrations de ces deux polluants ont été choisies de manière à refléter la situation sur le terrain et les doses appliquées correspondaient à 50  $\text{ng L}^{-1}$  pour le TBT et 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'atrazine, 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diuron et d'isoproturon pour le mélange de

pesticide. Cependant, les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un effet de ces concentrations environnementales après 6 jours d'exposition chez les huîtres. Greco *et al.* (2011) ont mis en place une batterie de biomarqueurs tissulaire (indice gonadosomatique) et biochimiques (activité catalase, cytochrome C oxydase, super oxyde dismutase, acetylcholine esterase et teneurs en malondialdéhyde) afin d'étudier l'effet d'une formulation commerciale à base de 2,4-D, mecoprop et dicamba ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement) chez *Mya arenaria*, pendant une période de 28 jours. Parmi le nombre important de réponses observées, il est intéressant de noter la baisse de l'activité catalase chez les individus exposés par rapport au témoins ainsi que des retards de maturation sexuelle. Les changements des paramètres physiologiques au niveau cellulaires et moléculaire après l'exposition à différentes classes de pesticides ont été rapportés par plusieurs auteurs. Ainsi, Revankar et Shyama (2009) ont noté une augmentation du nombre de micronoyaux chez le bivalve *Meretrix ovum* dès 2 jours d'exposition au monotrochophos (insecticide organophosphoré) et pour toutes les concentrations testées ( $5,5$ -  $11$ -  $16,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Bouilly *et al.* (2007) ont rapporté l'augmentation significative de l'aneuploïdie chez des huîtres adultes et chez leur descendance lorsque les individus sont exposés pendant 11 semaines à de faibles concentrations en diuron ( $300 \text{ ng L}^{-1}$  et  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Parallèlement aux effets sur les chromosomes, ces auteurs ont montré une augmentation significative de la mortalité cellulaire, de la phagocytose, de la production de DROs et du nombre de lysosomes après 4 semaines d'exposition et pour les deux doses de diuron. En utilisant des techniques de biologie moléculaire (hybridation soustractive et suppressive), Tanguy *et al.* (2005b) ont étudié l'expression différentielle des transcrits chez des individus de *C. gigas* soumis pendant 28 jours, d'une part, à un mélange d'atrazine, de diuron et d'isoproturon et, d'autre part, au glyphosate. Ces auteurs ont enregistré une expression modifiée pour un ensemble de gènes impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques telles que la détoxification des xénobiotiques, la régulation du cycle cellulaire et la respiration. En utilisant les mêmes techniques de biologie moléculaire couplées à des techniques biochimiques (tests Elisa), Collin *et al.* (2010) ont étudié l'effet d'un mélange de lindane, de metolachlor et de carbofuran chez des adultes de *C. gigas* provenant de deux sites différents et exposés pendant une période de 30 jours. Si les résultats n'ont pas montré de régulation claire de l'expression des gènes ou de la synthèse des protéines pendant l'exposition, des réponses dépendantes du lieu de provenance des huîtres ainsi que des organes pris en compte ont été démontrées.

Les objectifs de ce chapitre sont d'étudier l'impact de l'exposition d'une part au glyphosate (matière active) et, d'autre part, au Roundup Express<sup>®</sup> (formulation commerciale) et aux POEAs (mélange d'adjuvants) pendant des temps relativement longs (56 jours et 35 jours, respectivement) correspondant à des expositions « subchroniques ». Après examen des résultats décrits dans les publications précitées, il s'avère qu'un large éventail de réponses biologiques à différents niveaux d'organisation ont été enregistrés lors de l'exposition de bivalves à des contaminants pendant des périodes de temps relativement longs. En ce qui concerne la présente étude, les biomarqueurs étudiés ont été choisis de manière à prendre en compte des niveaux de réponses moléculaires, biochimiques et tissulaires. En plus du suivi de la mortalité, le suivi de la croissance (en poids et en taille) nous a semblé essentiel car il permet d'observer la réponse des juvéniles d'huîtres à la contamination de manière intégrée.

## 6.2 Matériel et méthodes

### 6.2.1 Plan expérimental et présentation des structures d'exposition

#### Matériel biologique

L'effet des expositions subchroniques aux herbicides a été évalué lors de deux expérimentations distinctes. La première expérimentation a été réalisée au printemps 2012 (11 avril - 6 juin) et s'est intéressée aux effets du glyphosate sur des juvéniles de *C. gigas*. La seconde expérimentation a eu lieu au printemps 2013 (29 avril - 3 juin) ; elle concernait les effets d'une formulation commerciale ( $R_{EX}$ ) et d'un mélange adjuvants sur des juvéniles d'une classe d'âge équivalente. Les concentrations auxquelles les huîtres ont été exposées pour les trois contaminants sont proches des valeurs pouvant être détecter dans l'environnement. Ces concentrations sont égales à  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  pour les trois contaminants. Les juvéniles utilisés pour les deux expérimentations proviennent de la SATMAR et sont issus de fécondations en éclosier à partir de géniteurs provenant de captage naturel. Les principales caractéristiques des lots étudiés sont résumés dans le tableau 6.1. La température moyenne est maintenue à  $17^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,5$ ) et la photopériode est de 10/14 jour/nuit lors des deux expérimentations.

TABLE 6.1 – Caractéristiques principales des juvéniles utilisés lors des expériences d'exposition subchroniques aux herbicides et adjuvants

	Exposition au glyphosate	Exposition au $R_{EX}$ & POEAs
Âge moyen	12 mois	18 mois
Poids moyen	$1,09 \text{ g} \pm 0,4$	$2,12 \pm 0,58$
Taille moyenne	$20,67 \text{ mm} \pm 2,7$	$28,28 \text{ mm} \pm 3,78$

En France depuis 2008, d'importantes mortalités ont été enregistrées dans les cheptels de jeunes huîtres en lien avec de fortes prévalences d'un variant d'un herpès virus ostréicole, l'OsHV-1  $\mu\text{Var}$  (Cochennec-Laureau *et al.*, 2010; Oden *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2011). Juste avant l'exposition subchronique des juvéniles de *C. gigas*, il nous est donc apparu important d'évaluer la charge virale des individus de façon à juger de l'éventuel risque de stress et/ou de mortalité lié à ce virus au cours des expériences. A cette fin, des échantillons d'huîtres ont été confiés au Dr. Aude Jouaux travaillant, dans le cadre du Centre de Référence sur l'Huître (CRH), sur les interactions hôte-pathogène-environnement. La détection virale a été faite par PCR en temps réel TaqMan<sup>®</sup> selon le protocole de Martenot *et al.* (2010) sur 10 pools de 5 individus pour chacune des deux expositions. Pour la première expérimentation (sur les effets du glyphosate), un seul pool sur les 10 s'est révélé positif avec, de plus, une faible charge

virale de 11000 UGs (Unité Génomique). En revanche, en 2013 (étude des effets du  $R_{EX}$  et des POEAs), les 10 pools présentaient une charge virale détectable. Cependant, cette charge était, dans les 10 cas, faible avec une valeur moyenne de 4265 UGs ( $\pm 4265$ ) et des valeurs minimales et maximales de 443 UGs et 12100 UGs, respectivement. Les lots étudiés en 2012 et surtout en 2013 pouvaient donc présenter des risques de mortalité à moyen ou long termes. Néanmoins, il importe de noter que les charges quantifiées n'étaient pas suffisantes pour engendrer des mortalités pendant la durée des expériences. En effet, selon Oden et al. (2011), un seuil de 440000 unités génomiques doit être atteint pour provoquer une épizootie.

### Structures expérimentales

L'étude des effets des différentes molécules pré-citées a nécessité des structures expérimentales que j'ai entièrement mis en place à l'aide des différents stagiaires que j'ai pu encadrer. Les structures expérimentales sont présentées dans les figures 6.1 et 6.2. Elles sont constituées d'un premier bac "de sécurité" ayant pour fonction de contenir l'eau contaminée en cas de fuite ou de renversement accidentel des différentes unités (Figure 6.2 A). Cette première enceinte contient 7 unités indépendantes en polypropylène (matière plastique chimiquement inerte) d'un volume de 12 litres chacune (Figure 6.2 B et D). Un tamis constitué de la même matière est placé dans chaque unité afin de permettre la manipulation des animaux et de faciliter les changements d'eau (Figure 6.2 D et E). Un exhausteur relié à une pompe à air est ajouté à chaque unité afin d'en permettre l'oxygénation. Chaque unité est recouverte d'une plaque en plexiglas afin de limiter la formation de micro-gouttelettes (Figure 6.2 B). Toutes les unités reçoivent indépendamment un apport de microalgues par un goutte à goutte dont le débit peut être régulé (Figure 6.2 C). Il est à noter qu'aucune pièce métallique n'a été utilisée pour la construction des structures d'exposition afin de ne pas biaiser l'expérimentation par l'ajout d'une contamination supplémentaire. Enfin, l'ensemble des pièces a été "biologisé" pendant une période d'un mois dans de l'eau de mer naturelle afin de permettre le relargage de toutes les substances potentiellement présentes dans le polypropylène.

L'expérimentation réalisée en 2012 a montré la fiabilité du système mais certaines améliorations ont été apportées aux structures pour la seconde exposition subchronique. Le principal changement a consisté en l'installation d'un système d'évacuation de l'eau par gravité dans chaque unité de 12 litres. Ce système permet d'améliorer les modalités de changement du milieu (Figure 6.1). En effet lors de la première expérimentation, les changements d'eau étaient réalisés à l'aide de "pompes à perceuse" qui



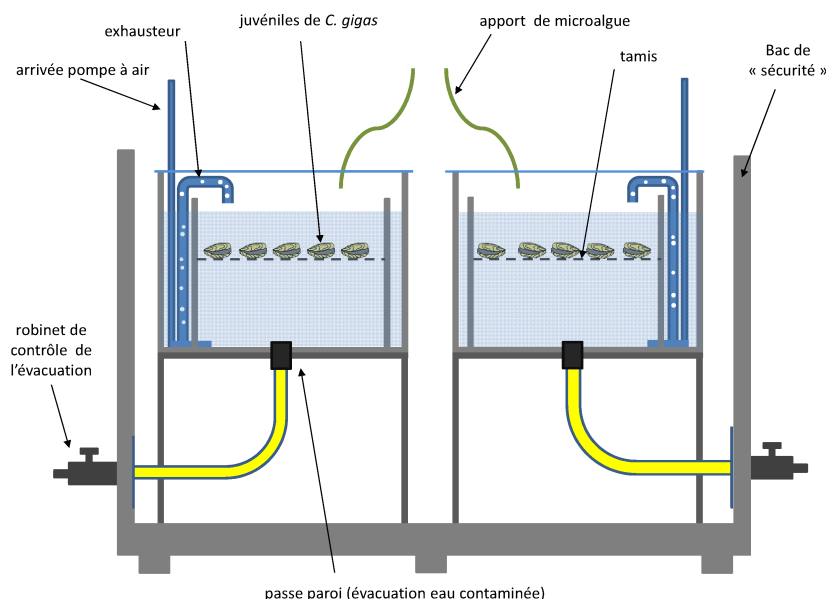


FIGURE 6.1 – Vue en coupe de la structure expérimentale avec deux unités sur les sept présentes

nécessitait la présence de trois personnes pour être correctement effectués. La modification du système a montré son utilité en réduisant les temps de changement complet de l'eau de 1h30 (3 personnes) à 45 min (1 personne).

L'eau de mer dans laquelle les huîtres sont exposées provient de Luc-sur-Mer. Elle est pompée à 300 mètres du rivage puis décantée au C.R.E.C (Centre de Recherches en Environnement Côtier). Afin de maintenir une qualité de l'eau la plus constante possible au cours du temps lors des deux expérimentations, un système de filtration mécanique et de double stérilisation par UV a été mis en place (Figure 6.3). Ce système permet la stérilisation de l'eau sans ajout de produits chimiques ni modification des caractéristiques physico-chimiques. La contamination par des molécules d'herbicides (même à de faibles doses) a rendu nécessaire la mise en place d'une filtration des eaux suite aux expositions. Cette filtration est assurée par un filtre à charbon actif plongé dans un réservoir dans lequel l'eau provenant des différentes unités est récupérée. Au cours des deux expériences d'exposition un changement d'eau partiel correspondant à 1/10<sup>e</sup> du volume total (1 litre) est effectué quotidiennement et l'eau des différents bac est changée entièrement tous les deux jours. Suite aux différents changement de milieu, les bacs sont recontaminés selon la proportion d'eau de mer renouvelée.

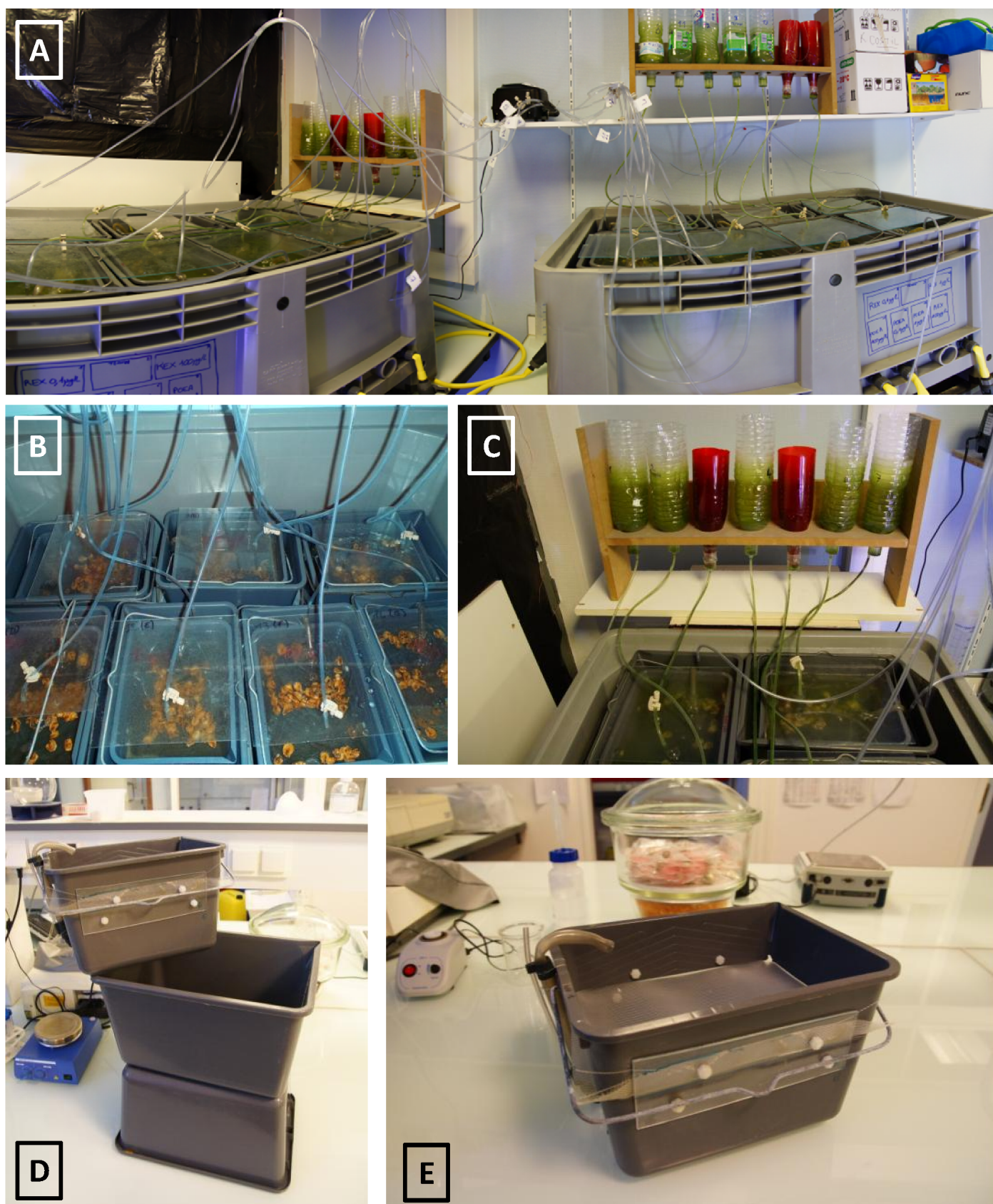


FIGURE 6.2 – Planche photographique représentant les deux structures utilisées pour l'exposition des juvéniles d'huîtres (A). Vue des juvéniles dans les unités d'exposition (B). Détail du système d'apport de microalgues (C). Vue des unités d'exposition et des tamis associés (D) et (E).

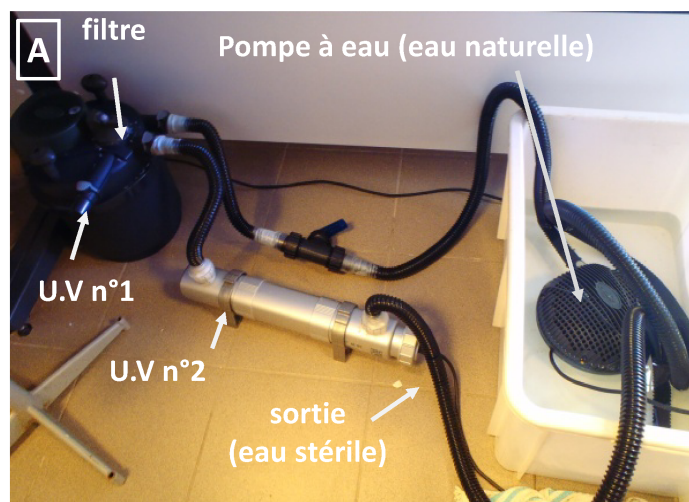


FIGURE 6.3 – Planche photographique présentant le système de filtration mécanique et de stérilisation de l'eau de mer

### Apport en microalgues

Afin de maintenir les animaux en élevage dans les meilleures conditions possible, un apport de nourriture sous la forme de culture de microalgues est fourni. Les microalgues proviennent de la collection Algobank de l'UCBN. Elles sont fournies sous forme d'un starter de 30 mL qui est repiqué successivement dans un volume de plus en plus grand pour atteindre progressivement un volume de deux fois 60 litres. La culture de microalgues est réalisée par nos soins au sein du laboratoire et elle a nécessité la mise en place de structures adaptées étant donné l'importance des volumes de culture nécessaires au bon maintien des huîtres (Figure 6.4). Le milieu de culture des microalgues est constitué d'eau de mer stérilisée et de milieu de Conway (au /1000<sup>e</sup>) enrichi en vitamines. La culture est éclairée en continu par deux néons de 36 watts et un de 18 watts produisant respectivement une lumière de 6500k et 10 000k. Lors de la première expérience d'exposition, l'apport en microalgues est réalisé grâce à *Isochrysis galbana* (souche T-ISO) choisie selon les recommandations du manuel de la FAO pour les éclosiers de bivalves (Helm *et al.*, 2006) (Figure 6.4 A). La ration moyenne au cours de la première expérimentation s'est élevée à  $4,47 \cdot 10^7$  cellules par huître et par jour. En analysant les résultats de cette première expérimentation, il a été décidé de remplacer l'espèce de microalgue par *Tetraselmis suecica* et de compléter cet apport par de la pâte d'algues à base de *Chaetoceros calcitrans* fournie par la SATMAR (Figure 6.4 B). Pour la seconde expérimentation des rations égales sont distribuées dans chaque bac, soit 1L de culture algale (en moyenne :  $2,09 \cdot 10^6$  cellules par mL) associée à de la pâte d'algue ( $1,00 \cdot 10^6$  cellules par mL).



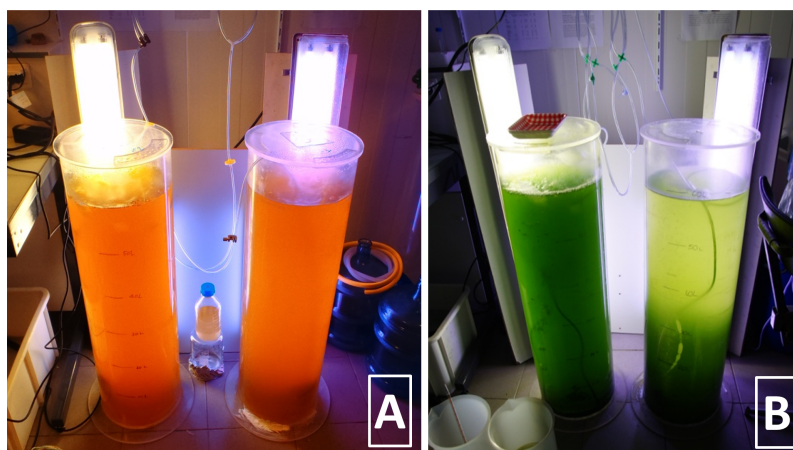


FIGURE 6.4 – Planche photographique des cylindres de culture de microalgues. A) *Isochrysis galbana* et B) *Tetraselmis suecica*.

### Échantillonnages et biométries

Les juvéniles mis en expérience sont observés journallement pour constater d'éventuels individus morts. En cas de mortalités, les morts sont aussitôt retirés et comptabilisés de façon à calculer des taux journaliers de mortalité par période entre deux échantillonnages. Le plan d'échantillonnage des différents biomarqueurs est précisé dans la figure 6.5. À chaque temps d'échantillonnage, plusieurs manipulations sont effectuées. Chaque huître est prélevée au hasard puis mesurée et pesée avant d'être décoquillée. L'ensemble des tissus ainsi que la coquille sont égouttés avant d'être de nouveau pesés. Les animaux sont ensuite disséqués et les différents tissus sont récupérés selon le biomarqueur étudié (Figure 6.6). En plus des données de croissance pondérale et en taille, la mesure du poids de tissus frais permet de calculer l'indice de condition AFNOR qui reflète le taux de remplissage des huîtres (Costil *et al.*, 2005). Cet indice est calculé à partir des données de poids de chairs et de poids total selon la formule :  $\frac{\text{poids de chair}}{\text{poids total}} \times 100$ .

### 6.2.2 Histologie

Des coupes histologiques sont pratiquées sur les juvéniles d'huîtres avec le double objectif d'une part, de sexer les animaux et déterminer leur stade de gamétogenèse et, d'autre part, d'évaluer la qualité des tissus par une approche histopathologique.

#### Protocole expérimental

Pour chaque individu destiné à l'histologie, une section de tissus d'environ 5 mm est réalisée antérieurement, à partir de la jonction palpes labiaux-branchies. Cette section est fixée pendant 24h dans une solution de Davidson (mélange d'éthanol, gly-

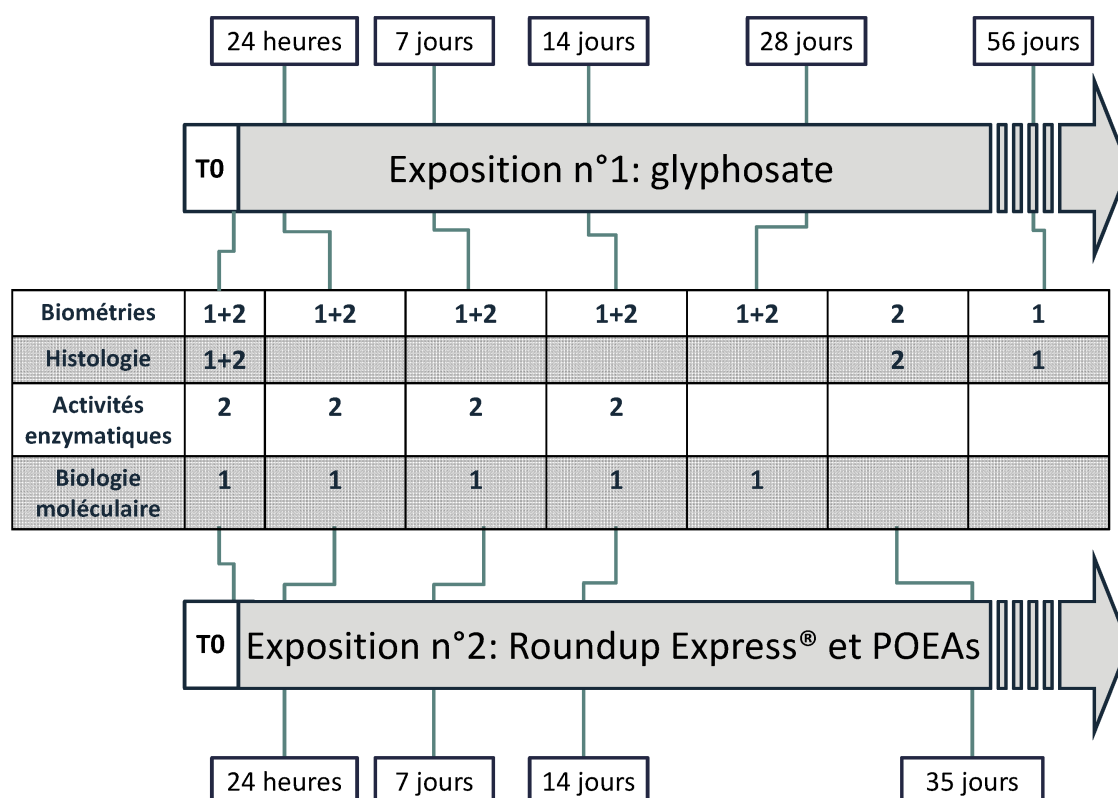


FIGURE 6.5 – Plan d'échantillonnage des huîtres pour l'étude des différents biomarqueurs lors des expositions au glyphosate (exposition 1 en 2012), R<sub>EX</sub> et POEAs (exposition 2 en 2013).

cérol, formol et eau de mer). En utilisant un automate Leica<sup>®</sup> TP1020, les tissus sont déshydratés dans une série de bains d'éthanol de concentrations croissantes (70, 96 et 100%) et de bains de butanol pour une durée totale de 48h. Après inclusion dans de la paraffine, les prélèvements histologiques sont coupés à une épaisseur de 3 µm puis colorés par un trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968) alliant l'hématoxyline de Groat (coloration des noyaux en gris-violet), l'éosine (coloration du cytoplasme et des sécrétions éosinophiles en rose) et le vert lumière (coloration du tissu conjonctif et des sécrétions cyanophiles en vert). Une fois placées entre lame et lamelle et séchées, les préparations histologiques sont observées au microscope photonique (× 400). Au cours de la première exposition subchronique au glyphosate, des coupes histologiques ont été réalisées à chaque date de prélèvement. Pour la seconde exposition, il a été choisi d'effectuer des coupes histologiques qu'au début (T0) et à la fin de l'expérimentation (T35j) car le déroulement de la gamétogenèse et l'altération des tissus constituent des biomarqueurs relativement tardifs.

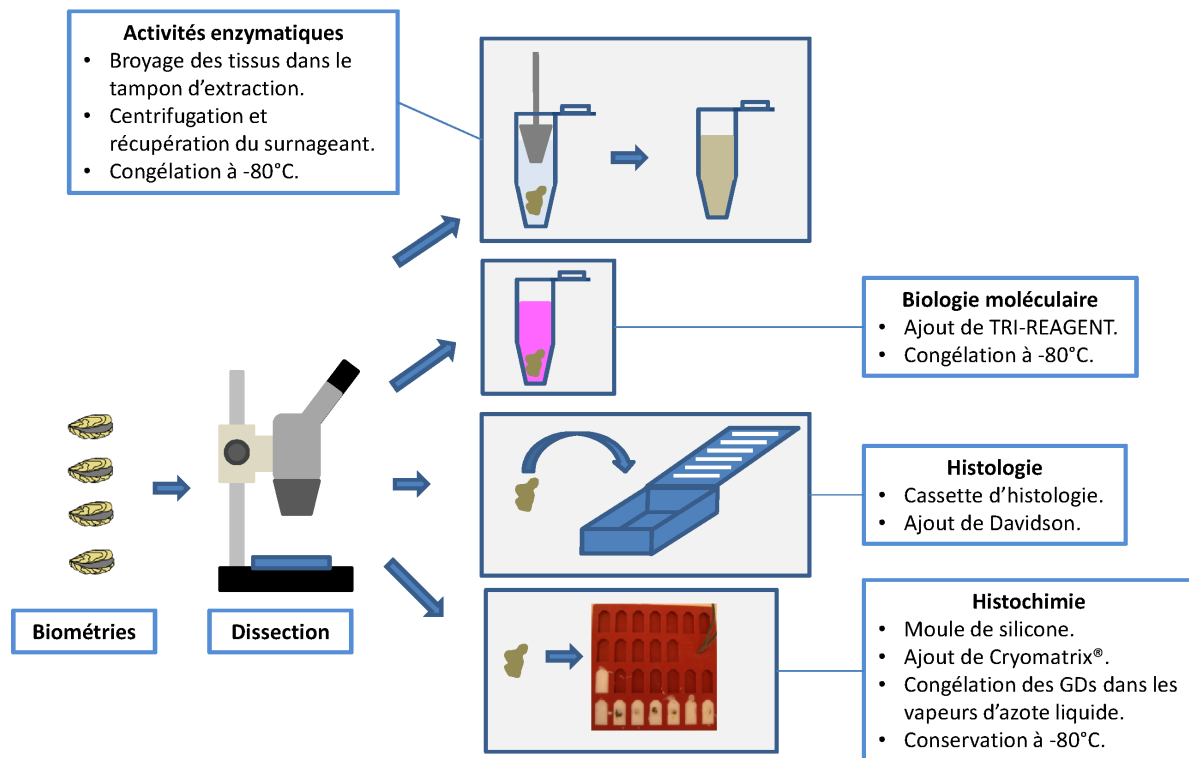


FIGURE 6.6 – Schéma récapitulatif du protocole expérimental mis en place lors des différents temps de prélèvement.

### Détermination du sexe et des stades de gamétogenèse

*Crassostrea gigas* est une espèce présentant un hermaphrodite successif (non obligatoire) à tendance protandre (Buroker, 1983) mais un faible pourcentage d'individus correspond à des hermaphrodites simultanés (Steele et Mulcahy, 1999). Le sexe des huîtres ne peut être déterminé macroscopiquement et seules des coupes histologiques (voire des biopsies en pleine période de maturité) peuvent nous renseigner *a posteriori* par rapport aux expositions. En plus des sexes mâle, femelle et éventuellement hermaphrodite, nous déterminons une 4<sup>e</sup> catégorie d'individus (dits «indéterminés») correspondant aux huîtres qui ne peuvent être sexées du fait d'un état d'avancement de la gamétogenèse insuffisant. Les tubules gonadiques se développent au sein d'un tissu conjonctif spécialisé dans le stockage du glycogène qui forme le tissu vésiculeux ou tissu de réserve (Heude Berthelin *et al.*, 2001). La gonade ne peut pas être individualisée et elle est donc qualifiée de diffuse. Le stade de gamétogenèse est défini en fonction de deux critères : l'ampleur du développement des tubules gonadiques et la différenciation des cellules germinales. Nous adoptons la nomenclature de Lubet (1959) qui distingue 4 stades et pour le stade de maturité sexuelle (III) trois sous-stades (Tableau 6.2).

TABLE 6.2 – Stades de gamétogenèse chez l’huître creuse avec les phases équivalentes à celles indiquées dans l’introduction générale. Modifié d’après Lubet (1969).

Stade 0 (phase 1)	<b>Phase de repos sexuel</b> : tubules réduits à des îlots de gonies quiescentes ; sexe indéterminable
Stade I (phase 2)	<b>Reprise de la gamétogenèse</b> : multiplication des gonies par mitoses successives ; tubules gonadiques peu développés ; sexe déterminable ou non (selon l’avancement dans le stade).
Stade II (phase 3)	<b>Phase de croissance</b> : développement intense des tubules qui sont néanmoins encore séparés par du tissu de réserve ; chez les femelles, les ovocytes commencent la vitellogenèse alors que chez les mâles, toutes les catégories de cellules sexuelles sont présentes (des gonies aux spermatozoïdes).
Stade III	<b>Période de maturité</b> : la gonade a atteint son volume maximal ; 3 sous stades sont distingués.
Stade III A (phase 4)	<b>Début de maturité</b> : gonades avec des gamètes matures mais spermatocytes et spermatogonies sont encore présents chez les mâles ; chez les femelles, des ovocytes sont encore en vitellogenèse.
Stade III B (phase 4)	<b>Initiation de la ponte</b> : la grande majorité ou la totalité des gamètes sont matures et la ponte (partielle) a débuté.
Stade III D (phase 5)	<b>Ponte ou post ponte</b> : la ponte est bien engagée avec de nombreux gamètes émis ou présents dans les canaux périphériques ; déstructuration de la gonade avec les tubules gonadiques en régression ; les gamètes non émis sont lysés.

Compte tenu de la date des expositions subchroniques (printemps 2012 et 2013), seuls des stades 0, I et II sont observés et illustrés dans la figure 6.7(a) et 6.7(b). Le stade II recouvrant des situations assez variées quant au développement des tubules gonadiques et la différenciation des cellules germinales, nous distinguons un stade II débutant où les tubules gonadiques sont encore peu développés ; de plus, chez les mâles, seules des spermatogonies et spermatocytes sont présentes et chez les femelles, certains ovocytes débutent la vitellogenèse alors que d’autres ne sont pas encore entrés dans cette phase.

#### Approche histopathologique

Les coupes histologiques permettent d’observer d’éventuelles altérations histopathologiques pouvant être le signe de stress environnemental. Plusieurs types d’anomalies tissulaires peuvent être déterminés et les trois types rencontrés chez les juvéniles d’huîtres lors des deux expositions subchroniques sont :

- des « atrophies » de la paroi des tubules de la glande digestive (Figure 6.8) en lien avec le cycle d’alimentation et de digestion (Morton, 1977) mais pouvant traduire un jeûne ;
- des infiltrations hémocytaires pouvant correspondre à des inflammations (Figure 6.9)
- des déstructurations du tissu conjonctif avec de vastes lacunes (notamment au niveau des aires digestive et gonadique) évoquant un tissu de réserve amoindri

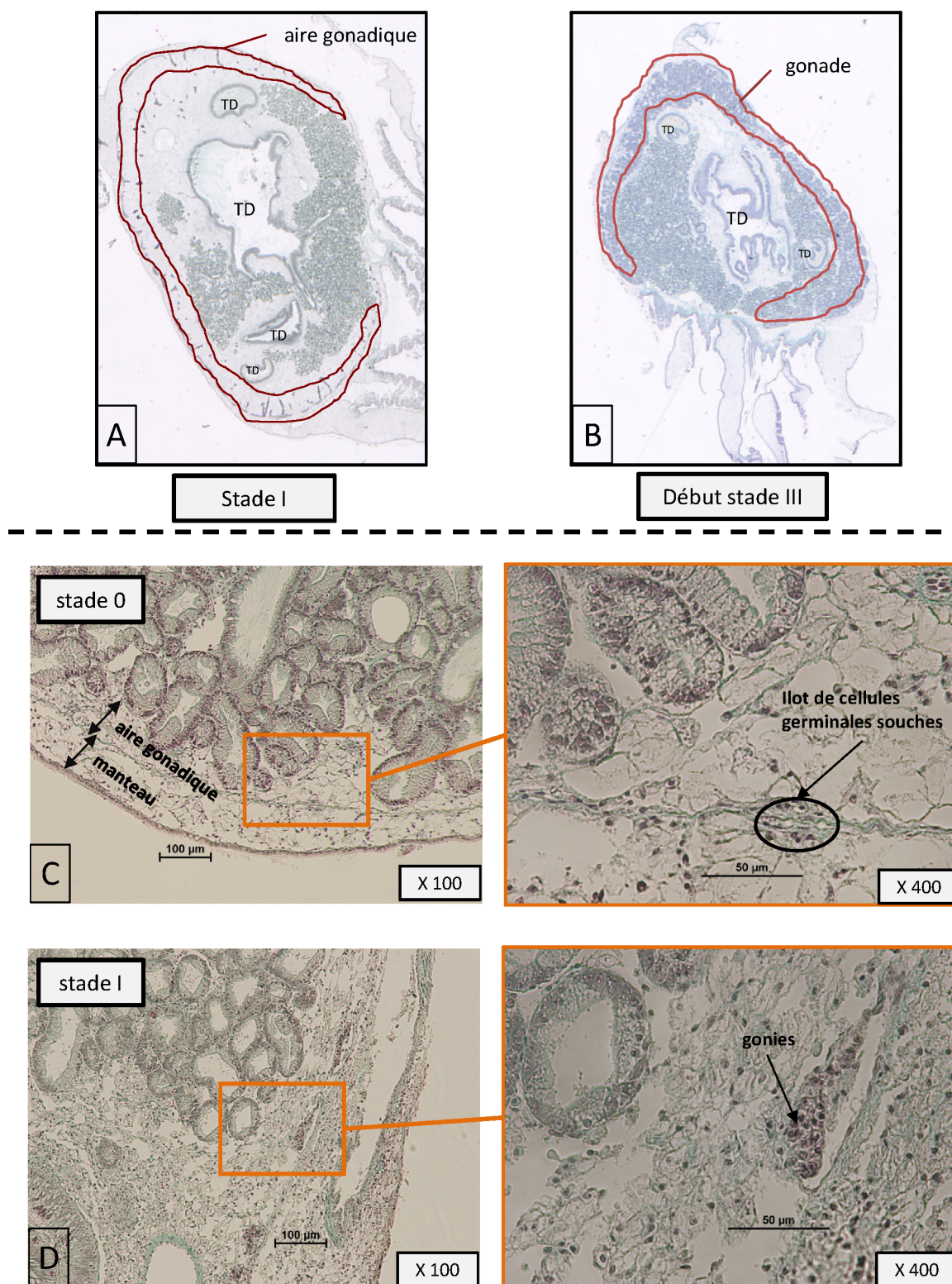
(Figure 6.10).

Sur chaque coupe histologique, les altérations tissulaires sont évaluées de façon semi-quantitative selon la classification de Buisson *et al.* (2008) établie suite à l'observation d'un grand nombre de coupes histologiques « normales » ou présentant des taux variables d'anomalies tissulaires.

TABLE 6.3 – Echelles semi-quantitatives adoptées pour qualifier l'ampleur des trois types d'altérations tissulaires. Les pourcentages indiqués correspondent à la proportion de tissus affectée par l'altération.

	Niveau 1 (faible)	Niveau 2 (modéré)	Niveau 3 (fort)	Niveau 4 (très fort)
Atrophie de l'épithélium de la GD	5-25%	25-50%	50-75%	> 75%
Infiltrations hémocytaires	5-10%	10-33%	33-50%	> 50%
Destructuration du tissu conjonctif	5-10%	10-33%	33-50%	> 50%

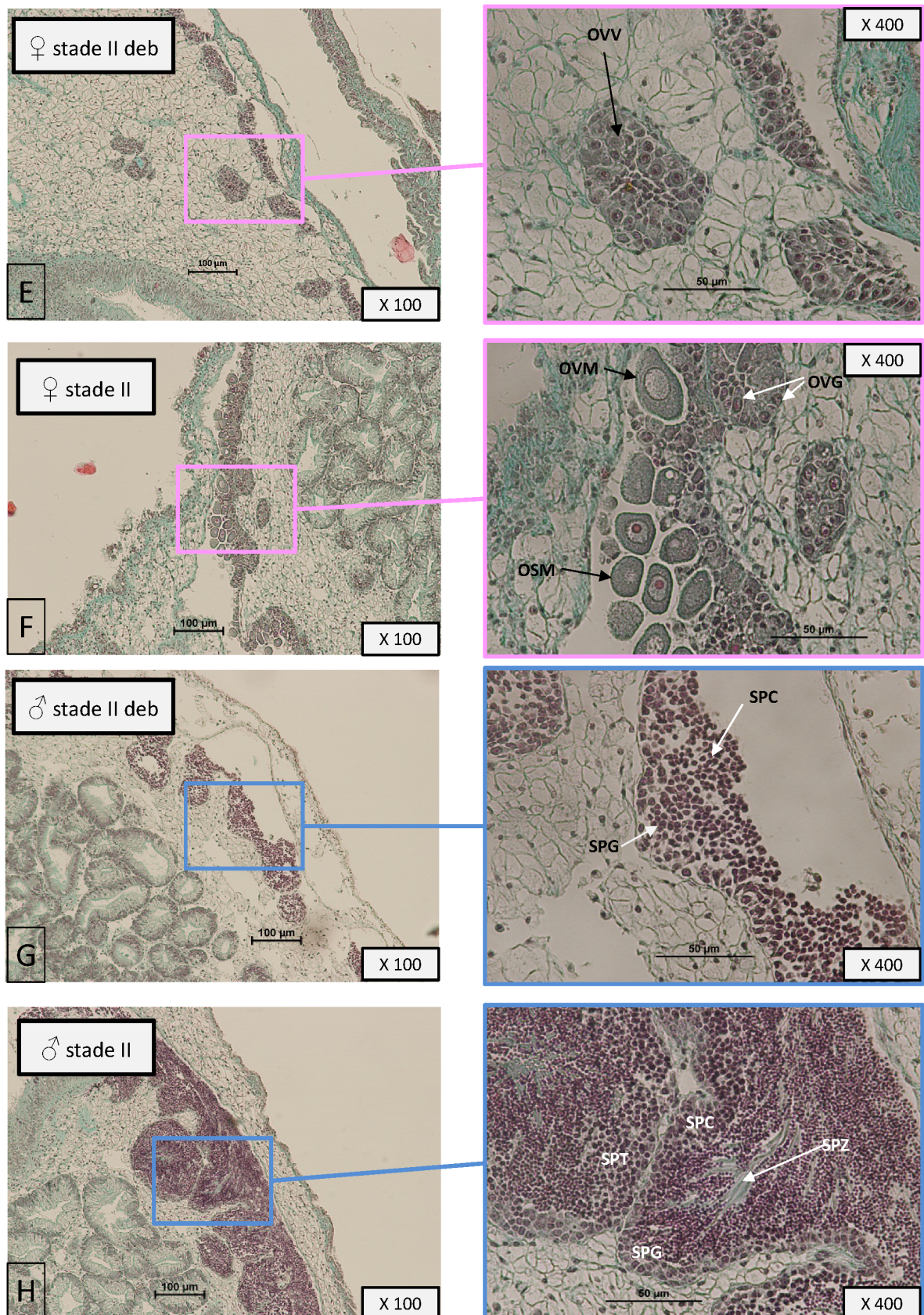




(a) Première partie

FIGURE 6.7 – Photographies de coupes histologiques présentant l'anatomie générale d'une huître en stade I (A) et en stade III (B). TD= tube digestif. Grossissement  $\times 10$ . Photographies de coupes histologiques présentant l'aspect des tissus reproducteurs pour des individus en stade 0 (C) et en stade I (D) aux grossissements  $\times 100$  et  $\times 400$ .





(b) Deuxième partie

FIGURE 6.7 – Photographies de coupes histologiques présentant l’aspect des tissus reproducteurs pour : (E) des individus femelles en début de stade II (OVV = ovocytes en vitellotogenèse) ; (F) des individus femelles en stade II (OVG = ovogonies, OSM = ovocyte sub-mature, OVM = ovocyte mature) ; (G) des individus mâles en début de stade II (SPG = spermatogonies, SPC = spermatocytes) et (H) des individus mâles en stade II (SPG = spermatogonies, SPC = spermatocytes, SPT = spermatides, SPZ = spermatozoides). Grossissements  $\times 100$  et  $\times 400$ .



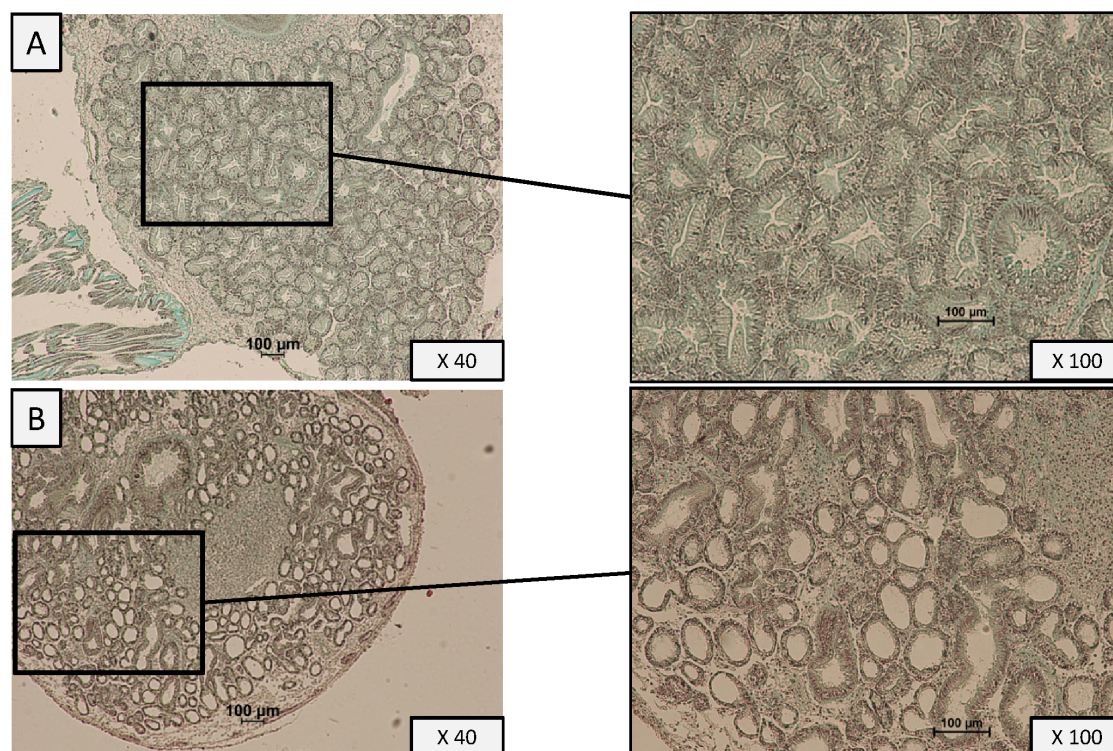


FIGURE 6.8 – Photographies de coupes histologiques illustrant en (A) l'absence et en (B) un très fort niveau (4) d'atrophies de la paroi des tubules de la glande digestive. Grossissements  $\times 40$  et  $\times 100$ .

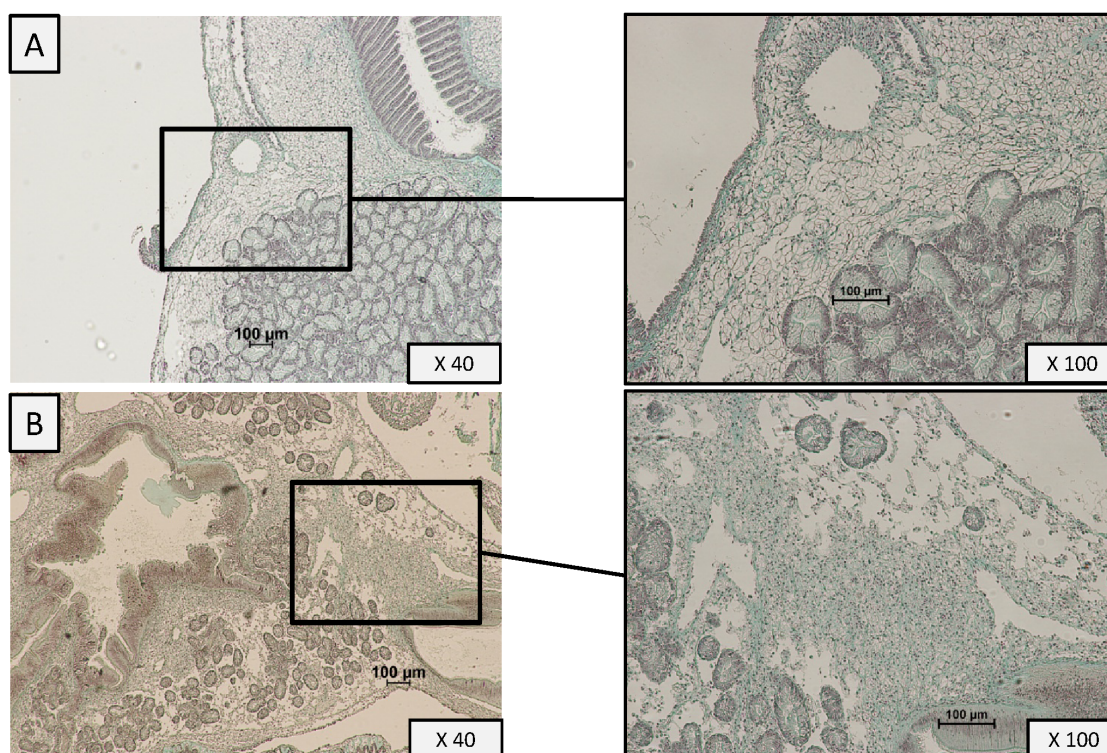


FIGURE 6.9 – Photographies de coupes histologiques illustrant en (A) l'absence et en (B) un très fort niveau (4) d'infiltrations hémocytaires. Grossissements  $\times 40$  et  $\times 100$ .



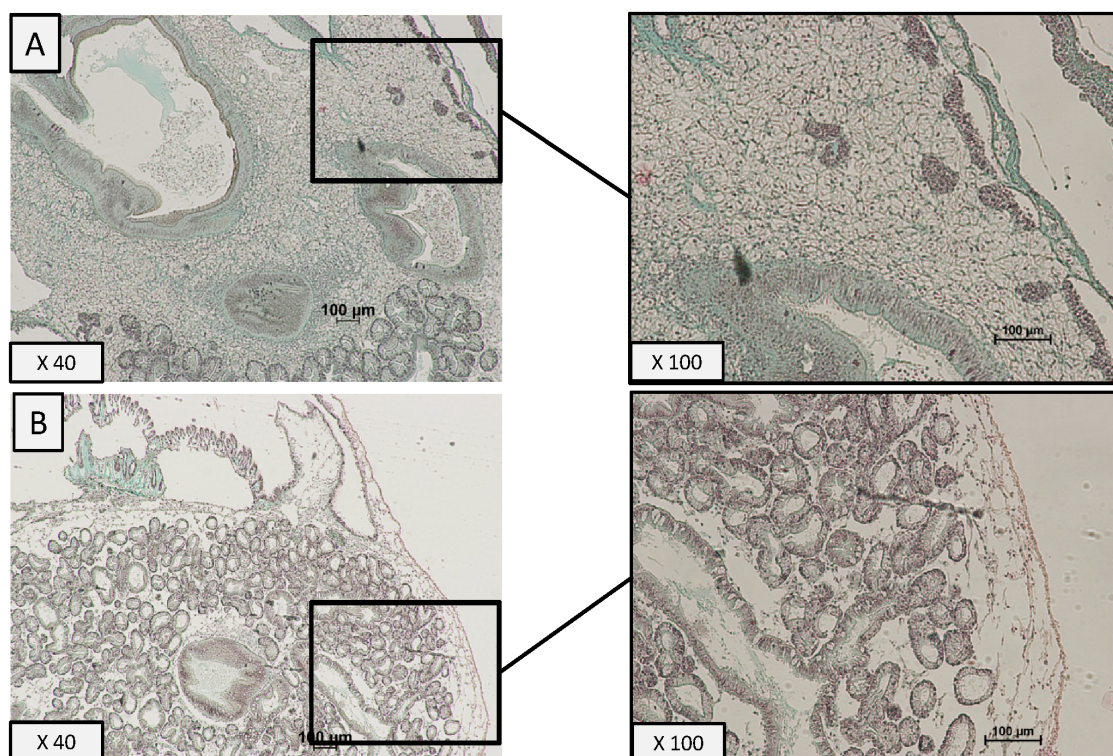


FIGURE 6.10 – Photographies de coupes histologiques illustrant en (A) l'absence et en (B) un très fort niveau (4) de déstructurations du tissu conjonctif. Grossissements  $\times 40$  et  $\times 100$ .

### 6.2.3 Mesure de la peroxydation lipidique et de l'activité enzymatique des catalases et GSTs

#### Extraction des composés à doser

Lors de la première expérimentation, l'extraction des composés à doser a été réalisée directement après dissection des animaux et les extraits ont été conservés à -80°C. Lors de la seconde expérimentation, les différents tissus ont d'abord été congelés après dissection puis stockés à -80°C avant que les différents composés ne soient extraits juste avant analyse. Pour extraire les enzymes et produits de la peroxydation lipidique, les tissus sont broyés sur glace à l'aide d'un homogénéiseur de type Potter-Elvehjem dans un tampon d'extraction (NaCl 500 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,1 mM; pH 7,4) contenant un inhibiteur de protéase (Thermoscientific®) dilué au 1/100. Les échantillons sont broyés une première fois dans un volume correspondant à 2 µL par mg de tissus puis centrifugés pendant 15 min (4°C, 12500 g). Le surnageant est récupéré et aliquoté tandis que le reste de l'échantillon est centrifugé une deuxième fois (15 min, 4°C, 12500 g) afin de récupérer le maximum de surnageant.

#### Dosage des protéines

Le dosage des protéines repose sur une méthode colorimétrique faisant appel au kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad®), d'après la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le bleu brillant de Coomassie en solution acide réagit avec les protéines en formant une coloration bleue. En mesurant l'absorbance des échantillons à 595 nm et en se rapportant à celles obtenues pour une gamme étalon, il est possible de connaître la quantité de protéines présentes dans un échantillon. L'ensemble des étapes est réalisé sur glace. Une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) de 0 à 500 mg L<sup>-1</sup> (0-50-100-150-200-300-400-500) est préparée par dilution dans le tampon d'extraction d'une solution mère de BSA à 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Les échantillons sont dilués au 1/200 dans du tampon d'extraction. Dans les puits d'une microplaque, 10 µL de standard ou d'échantillon sont déposés en triplicat. 200 µL de réactif Bio Rad (dilué au 1/5 dans de l'eau ultrapure) sont déposés dans les puits. Après 10 min, l'absorbance est mesurée à 595 nm grâce à un lecteur de microplaques (Flexstation 3®, Molecular Device™).

#### Mesure de l'activité Catalase

Les catalases catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{CAT}} \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ .

Ces enzymes sont dosées par une méthode spectrophotométrique en mesurant la baisse de l'absorbance du peroxyde d'hydrogène à 240 nm (UV) (Deisseroth et Dounce, 1970). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommées par minute (= 1 U de catalase). À partir d'une solution mère de catalase à 1000 U (standard de catalase de foie de bovin), une gamme allant de 0 à 6 U est préparée (0U-1U-2U-3U-4U-5U-6U). Les concentrations en catalases dans les glandes digestives de *C. gigas* sont particulièrement importantes par rapport à d'autres espèces telles que la seiche (*S. officinalis*) (Le Pabic, *com. pers.*). Les échantillons déjà utilisés pour le dosage protéique sont dilués par un facteur de dilution finale de 2400 dans le tampon d'extraction. 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de standard sont déposés dans les puits d'une micro plaque UV (UVstar<sup>®</sup>, Greiner Bio-One GmbH) auxquels sont ajoutés 100  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dilués à 28 mM. La lecture est faite en cinétique à 240 nm et à 25°C pendant 15 minutes (Flexstation 3<sup>®</sup>, Molecular Device<sup>™</sup>).

#### Mesure de l'activité GST

Les GSTs sont impliquées dans les phénomènes de conjugaison des métabolites issus de la phase I ou de molécules susceptibles d'être directement attaquées (car portant un site électrophile). Ces enzymes assurent la conjugaison du glutathion (peptide antioxydant sous sa forme réduite) aux contaminants afin d'en faciliter l'élimination. Le produit final de la conjugaison est un complexe hydrosoluble, généralement moins toxique et plus rapidement éliminé par l'organisme. L'activité des GSTs est appréhendée par la mesure de l'absorbance à 340 nm correspondant à la formation d'un conjugué entre le glutathion réduit (GSH) et un substrat modèle, peu spécifique des différentes isoenzymes de GST : le Chloro-2,4-DinitroBenzène (CDNB), selon la réaction suivante :  $\text{GSH} + \text{CDNB} \xrightarrow{\text{GSTs}} \text{GS-DNB} + \text{HCl}$ .

L'activité GST est évaluée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon dilué (1/100) dans du tampon d'extraction et 200  $\mu\text{L}$  de solution de réaction (GSH 1mM ; Hepes 10 mM ; NaCl 125mM ; CDBN 1 mM ; pH 6,2) sont ajoutés dans les puits d'une microplaque. La lecture de l'absorbance se fait à 340 nm en cinétique pendant 20 minutes.

#### Mesure de la peroxydation lipidique

Le Malondialdéhyde (MDA) est un produit de la peroxydation lipidique marquant le stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des DROs sur les acides gras polyinsaturés. Le dosage du MDA est réalisé grâce au kit MDA-586 (Oxis-Research<sup>®</sup>) selon

la méthode décrite par Gérard-Monnier *et al.* (1998). Toutes les étapes du dosage sont effectuées sur glace. Une gamme étalon est préparée à partir du standard fourni par le kit (0-0,5-1-2,5-5-10  $\mu\text{M}$ ). Le réactif R1 (97,7% d'Acétonitril) est dilué par 1/4 dans du méthanol. Les échantillons sont dilués pour obtenir une concentration finale de 8 g L<sup>-1</sup> de protéines. Dans des tubes à centrifuger, 60  $\mu\text{L}$  d'échantillons ou de standard dilué sont mélangés à 3  $\mu\text{L}$  de probucol, 192  $\mu\text{L}$  de réactif R1 dilué et 45  $\mu\text{L}$  de réactif R2. 80  $\mu\text{L}$  du mélange précédent sont déposés dans les puits d'une microplaque et la lecture des D.O est faite à 586 nm.

#### 6.2.4 Mesure de l'expression transcriptionnelle de gènes cibles : technique de PCR en Temps Réel (RT-PCR)

La mesure de l'expression transcriptionnelle de gènes cibles réalisée au cours de cette thèse a fait l'objet d'une collaboration avec le Laboratoire de Radioécologie de l'IRSN de Cherbourg-Octeville et l'ensemble des analyses y ont été réalisées. L'expression de 9 gènes cibles a été quantifiée après exposition pendant 28 jours au glyphosate. Le choix de ces gènes a été fait en considérant les travaux menés antérieurement à l'IRSN (Farcy, 2006; Devos *et al.*, 2012). Les gènes étudiés correspondent à des protéines qui présentent des fonctions différentes :

- Détoxification : GST, CYP450, MXR ; MT 1&2 ;
- protéines chaperonnes : HSC72, HSP70, HSP90 ;
- régulation du stress oxydant : SOD ;
- régulation du cycle cellulaire : P53.

En supplément des 9 gènes précités, l'expression de 3 gènes de références a été étudiée afin de normaliser les résultats : l'actine qui codent pour une protéine du cytosquelette, l'ARN ribosomal 18S et Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui code pour une enzyme impliquée dans la glycolyse.

#### Extraction et dosage des ARNs totaux

À chaque temps d'échantillonnage, la glande digestive et les branchies des juvéniles exposés sont prélevées, égouttées, pesées puis placées dans des tubes Eppendorf®. Les extractions sont toujours effectuées sur glace. Un volume de TRI-REAGENT®(Sigma-Aldrich®) 10 fois égal au poids des tissus (mg) est immédiatement ajouté et les échantillons sont conservés au congélateur à -80°C (Figure 6.6). Les échantillons sont décongelés et broyés dans le TRI-REAGENT à l'aide d'un piston exempt de RNases. Une première centrifugation (10 mn, 12 000 g, 4°C) est effectuée afin d'éliminer les débris

tissulaires et 300  $\mu\text{L}$  de surnageant sont récupérés. 200  $\mu\text{L}$  de chloroforme sont ajoutés au surnageant et après 10 minutes d'incubation, le mélange est centrifugé (15 mn, 12 000 g, 4°). Après centrifugation, trois parties se distinguent dans le tube : la phase inférieure organique est de couleur rouge et contient des protéines et de l'ADNg génomique (ADNg), l'interphase composée majoritairement d'ADNg et la phase aqueuse supérieure qui est incolore et contient les ARNs. En prenant soin de ne pas prélever l'interphase, la phase supérieure est récupérée et les ARNs qu'elle contient sont précipités en ajoutant 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol. Après une nouvelle centrifugation (10 mn, 12 000g, 4°C), le culot d'ARNs est remis en suspension et rincé dans de l'éthanol 75%. Une dernière centrifugation (10 mn, 12 000g, 4°C) est réalisée afin d'éliminer l'éthanol puis les culots d'ARNs sont séchés pendant 1h dans une cloche à dessiccation. Les culots sont finalement repris dans un volume d'eau traitée DEPC (DiEthylPyroCarbonate). Le dosage de la quantité et de la qualité des ARNs est réalisé grâce à un spectrophotomètre UV. La lecture de la D.O à 260 nm permet de mesurer la concentration en ARNs, une unité de D.O correspondant à une concentration de 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Le degré de pureté des ARNs est indiqué par le rapport entre les absorbances mesurées à 260 nm (acides nucléiques) et 280 nm (absorbance des acides aminés tyrosine et tryptophane des protéines), la valeur optimale de ce rapport étant de 2. Suite au dosage, les échantillons sont dilués afin d'atteindre la concentration de 550 ng d'ARNs totaux dans 8  $\mu\text{L}$  d'eau DEPC.

#### Traitement DNase

La mesure de l'expression transcriptionnelle d'un gène repose sur la quantité d'ARNs présente dans les tissus au moment du prélèvement. Cette technique nécessite une étape de rétro-transcription des ARNs en ADNc qui est la molécule avec laquelle est ensuite effectuée la RT-PCR. Cependant, et en dépit de toutes les précautions prises lors de l'étape d'extraction, une contamination par de l'ADNg peut être présente au sein des échantillons. Afin de ne pas interférer avec l'étape de quantification, un traitement à la DNase est nécessaire pour éliminer toute trace d'ADNg. Les échantillons sont traités grâce à l'ajout de 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de DNase I à 1U  $\text{L}^{-1}$  (Amplification grade DNase I Sigma-Aldrich® : 50% glycerol, 10mM Tris-HCl, 10mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7.5) et 1  $\mu\text{L}$  de tampon spécifique (10X reaction buffer Sigma-Aldrich® : 200 mM Tris-HCl, 20mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8.3). Après 10 min d'incubation, la réaction est bloquée par ajout d'une solution spécifique contenant 50 mM d'EDTA qui désactive la DNase par chélation des ions calcium et magnésium (STOP solution, Promega®). Les



échantillons sont ensuite incubés pendant 10 min à 70°C afin de dénaturer la DNase I. L'efficacité du traitement DNase est assurée en gardant 1 µL d'échantillon qui sera analysé par RT-PCR.

### Rétro-transcription

La première étape de la rétro-transcription consiste en l'hybridation d'amorces aléatoires (random primers, Promega®) sur les brins d'ARN. Cette étape est réalisée par ajout de 1 µL de solution à 0.5 µg µL<sup>-1</sup> aux ARNs préalablement linéarisés par 5 min d'incubation à 70°C. Les échantillons sont transférés sur la glace afin de permettre l'hybridation. La rétro-transcription des ARNs est assurée par la retro-transcriptase du virus de la leucémie murine (1 µL de Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase, 200 U/µL Promega®) en présence de 1,25 µL de désoxyribonucléotide (dNTP 10mM) et de 0.625 µL de RNAsin (Recombinant RNAsin Ribonuclease Inhibitor 40 U µL<sup>-1</sup>). La polymérisation est réalisée à 37°C pendant 1 heure.

### Quantification par PCR en temps réel

La PCR en temps réel repose sur les mêmes principes que la PCR classique mais elle permet de suivre, à chaque cycle de polymérisation, la génération des amplicons correspondant au gène ciblé. Cette technique est possible grâce à l'utilisation d'un fluorophore, le SYBR Green. À l'état libre ce fluorophore possède une fluorescence peu intense qui augmente considérablement lorsqu'il est intercalé au sein de l'ADN double brin. En mesurant la fluorescence à chaque cycle, il est possible de quantifier le nombre d'amplicons qui est proportionnel à celle-ci. En effet, la mesure de la fluorescence permet de déterminer à partir de quel moment le signal sort du bruit de fond : c'est le Ct (Cycle threshold) qui est représentatif de la quantité d'ARN initiale. L'expression du gène cible est toujours donnée par rapport à celle du gène de référence (Actine, 18S ou GAPDH) selon la formule suivante :

$$\text{Niveau normalisé d'ARNm du gène cible} = 2^{(\text{ct gène référent} - \text{ct gène cible})}$$

L'amplification est réalisée en utilisant le kit MyiQ supermix (BIORAD®) : les 15 µL de mélange réactionnel sont constitués de 5 µL d'ADNc dilué, 7,5 µL de mélange d'amplification Supermix 2X iQ SybrGreen et de 0,5 µM (2,5 µL) d'amorces oligonucléotiques spécifiques de l'ADNc à quantifier. Les amorces utilisées sont précisées dans le tableau 6.4. Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes : 90 secondes à 95°C (activation de la polymérase), 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 45 secondes à

60°C pour l'hybridation des amorces et l'élongation. A la fin de la RT-PCR, la courbe de fusion des amplicons est effectuée entre 55 et 95°C avec une incrémentation de 0,5°C par cycle. Cette courbe de fusion permet de calculer la température de fusion ( $T_m$ ) des amplicons formés et de la comparer avec celle des produits attendus.

TABLE 6.4 – Séquence et numéro d'ordre GenBank des amorces utilisées pour quantifier l'expression des gènes cibles (†) et des gènes de référence (●).

Gène (ou ARN)	Numéro d'ordre	Amorce sens	Amorce antisens
GST †	AJ557140	5' AACGCCACCATTCACGAC 3'	5' AAGACCCCAACCAATGCT 3'
CYP450 †	AF075692	5' CCCTGGGAGTTCAAACCTG 3'	5' CGAGCGCAAATCCAATAAA 3'
MXR †	AJ422120	5' CCGAGAACATCCGCTACG 3'	5' GCCCTGTGGGAGTTCCTT 3'
Hsc72 †	AF144646	5' GAGGATCGCAGCCAAGAA 3'	5' TATCGCCCTCGCTGATCT 3'
Hsp70 †	AJ305315	5' AGCAAGCCAGCACAGCA 3'	5' GCGATGATTTCACCTTC 3'
Hsp90 †	AJ431681	5' GGAGAGCAAAACCTCACC 3'	5' TGGCAATGGTTCCAAGGT 3'
MT1&2 †	AJ243263	5' TGTCTGATCCATGTAAGTCACT 3'	5' TCAGGCTGCAAAGTCAAGTG 3'
SOD †	AJ496219	5' AACCCCTTCAACAAAGAGCA 3'	5' TTTGGCGACACCGTCTTC 3'
p53 †	AM236465	5' ACCCAGCTCCGACTCATTT 3'	5' TCATGGGGGATGATGACAC 3'
Actine ●	AF026063	5' GCCCTGGACTTCGAACAA 3'	5' CGTTGCCAATGGTGATGA 3'
18S ●	AB064942	5' CGGGGAGGTAGTGAC GAA 3'	5' ACCAGACTTGCCCTCCAA 3'
GAPDH ●	AJ544886	5' TTGTCTTGCCCTCTTGC 3'	5' CGCCAATCCTTGTTGCTT 3'

### Analyse statistique des résultats

Pour les données biométriques, biochimiques et de biologie moléculaire les résultats sont analysés à l'aide d'ANOVAs lorsque les conditions d'application sont réunies (normalité et homoscedasticité). Quand des différences significatives sont révélées, des tests post-hoc de comparaisons multiples (Student Newman Keuls : SNK) sont appliqués. Lorsqu'une des deux conditions d'application de l'ANOVA n'est pas atteinte même après transformation, les données sont analysées grâce au test de Kruskal & Wallis (test non-paramétrique) suivi de tests de comparaisons multiples (Dunn). Les données semi-quantitatives d'altérations histopathologiques sont analysées par des tests de Kruskal & Wallis. Enfin, les données d'occurrence des stades de gamétogenèse sont traitées statistiquement par des tests exacts de Fisher.

## 6.3 Résultats

### 6.3.1 Mortalité et croissance

Lors de la première expérimentation (glyphosate), aucune mortalité n'a été observée quel que soit le temps ou la condition considéré. Des mortalités faibles ont été enregistrées lors de la deuxième expérimentation et le taux de mortalité journalier moyen s'est élevé à 0,11 ( $\pm 0,07$ ) sur la période d'étude. Aucune évolution temporelle significative n'a été démontrée sur les 5 semaines d'expérience (K-W :  $p > 0,05$ ). De plus, les expo-

sitions aux deux types de substances et aux trois concentrations testées n'ont pas non plus affecté significativement la mortalité des individus (K-W :  $p > 0,05$ ).

La croissance des animaux au cours du temps est appréhendée par la mesure de l'évolution de trois paramètres différents que sont la taille, le poids et l'indice de condition AFNOR. Lors de l'exposition des huîtres au glyphosate, aucune différence significative n'est mise en évidence au niveau de la taille que ce soit entre les différentes conditions après 56 jours d'exposition ou entre le début et la fin de l'expérimentation pour une condition donnée (Figure 6.11) (ANOVAs :  $p > 0,05$ ). Lors de l'exposition au R<sub>EX</sub> et aux POEAs, une tendance à l'augmentation de la taille est observée pour les individus témoins entre le début (28,66 mm  $\pm$  3,96) et la fin de l'expérimentation (29,61 mm  $\pm$  3,48) (Figure 6.11) (Les valeurs brutes sont données  $\pm$  l'écart-type). Cette tendance n'est pas notée pour les individus exposés aux différentes concentrations de R<sub>EX</sub> ou de POEAs et aucune différence significative n'est observée entre la taille des huîtres du début et de la fin d'expérimentation. En revanche, des différences significatives (SNK :  $p < 0,05$ ) sont enregistrées à 35 jours d'expérimentation lorsque la taille des individus témoins (29,61 mm  $\pm$  3,48) est comparée à celle des huîtres exposées aux concentrations de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (27,00 mm  $\pm$  3,30) et 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  (27,40 mm  $\pm$  4,00) de R<sub>EX</sub> et à l'ensemble des concentrations de POEAs (0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  : 27,13 mm  $\pm$  3,65 ; 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  : 27,76 mm  $\pm$  3,25 ; 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  : 27,5 mm  $\pm$  3,09) (Figure 6.11 R<sub>EX</sub> POEAs).

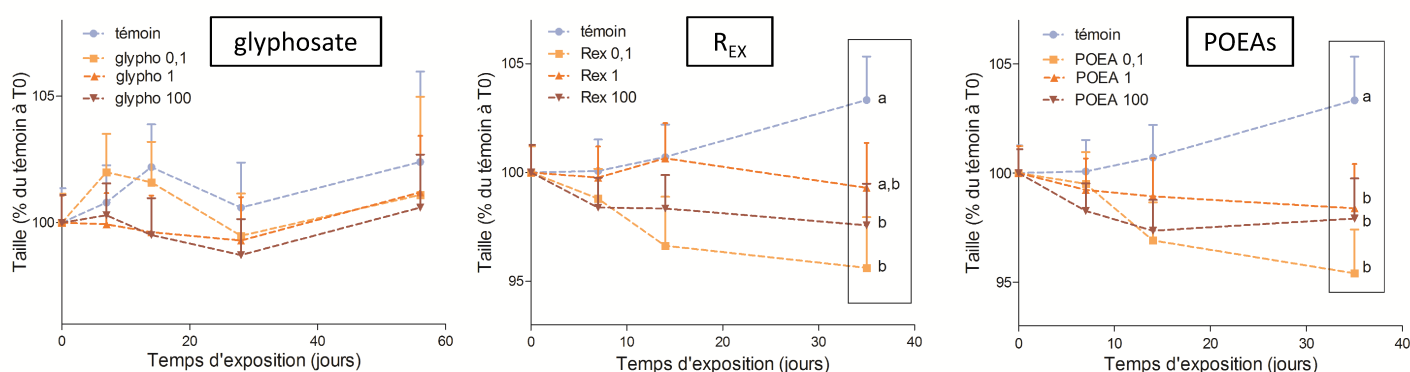


FIGURE 6.11 – Évolution de la taille des huîtres (moyennes  $\pm$  SEM) exposées au glyphosate, Roundup Express® et POEAs. Les résultats sont exprimés en % de la taille des individus au début de l'exposition (T0). La taille moyenne des individus à T0 est de 24,54 mm  $\pm$  2,28 pour l'exposition au glyphosate et de 28,35 mm  $\pm$  3,74 pour l'exposition aux R<sub>EX</sub> et POEAs. Exposition au glyphosate  $\Rightarrow$  Individus témoins à T0 : n= 74, T7 jours : n= 58, T14 jours : n= 46, T28 jours n= 34, T56 jours n= 8 ; Individus par concentration à T0 : n= 148, T7 jours : n= 115, T14 jours : n= 91, T28 jours n= 67, T56 jours n= 16. Exposition au R<sub>EX</sub> et POEAs  $\Rightarrow$  Individus par concentration (dont témoins) à T0 : n=120 , T7 jours : n= 88 , T14 jours : n= 64 , T35 jours n= 39.

La croissance pondérale des huîtres lors de l'exposition au glyphosate s'est révélé-

lée faible. En effet, la différence de poids des individus témoins entre le début ( $1,09 \text{ g} \pm 0,40$ ) et la fin ( $1,17 \text{ g} \pm 0,47$ ) de l'exposition est égale à  $0,08 \text{ g}$  et aucune différence statistique n'est mise en évidence dans le temps ou à un temps donné entre les différentes concentrations (Figure 6.12) (ANOVAs :  $p > 0,05$ ). L'évolution du poids des huîtres témoins lors de l'exposition au  $R_{EX}$  et aux POEAs a été de  $0,15 \text{ g}$  après 35 jours d'exposition (de  $2,11 \text{ g} \pm 0,65$  à  $2,26 \text{ g} \pm 0,67$ ) soit une augmentation de  $7,11 \%$ . Cependant, les tests statistiques n'ont pas permis de révéler une croissance significativement plus élevée entre le début et la fin de l'expérimentation (ANOVA :  $p > 0,05$ ) (Figure 6.12). L'exposition des huîtres aux différentes concentrations du mélange d'adjuvants n'a pas affecté la croissance en poids (ANOVA :  $p > 0,05$ ). De même il n'a pas été possible d'observer de différences significatives au cours du temps lors de l'exposition au  $R_{EX}$  (ANOVA :  $p > 0,05$ ) ; néanmoins après 14 jours d'exposition, le poids des individus témoins ( $2,19 \text{ g} \pm 0,66$ ) s'est révélé significativement plus élevé (SNK :  $p < 0,05$ ) que celui des huîtres exposées à la plus faible concentration de  $R_{EX}$  ( $1,92 \text{ g} \pm 0,63$ ) (Figure 6.12).

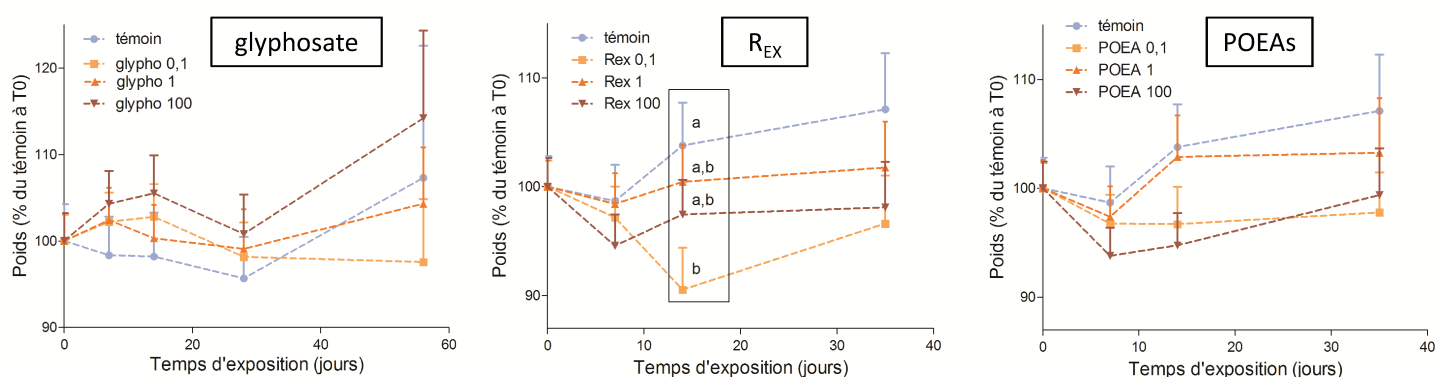


FIGURE 6.12 – Évolution du poids (moyennes  $\pm$  SEM) des huîtres exposées au glyphosate, Roundup Express® et POEAs. Les résultats sont exprimés en % du poids des individus au début de l'exposition (T0). Exposition au glyphosate  $\Rightarrow$  Individus témoins à T0 :  $n = 74$ , T7 jours :  $n = 58$ , T14 jours :  $n = 46$ , T28 jours :  $n = 34$ , T56 jours :  $n = 8$  ; individus par concentration à T0 :  $n = 148$ , T7 jours :  $n = 115$ , T14 jours :  $n = 91$ , T28 jours :  $n = 67$ , T56 jours :  $n = 16$ . Exposition au  $R_{EX}$  et POEAs  $\Rightarrow$  Individus par concentration (dont témoins) à T0 :  $n = 120$ , T7 jours :  $n = 88$ , T14 jours :  $n = 64$ , T35 jours :  $n = 39$ .

L'indice AFNOR qui traduit le remplissage de la coquille par la chair est significativement plus faible après 56 jours d'exposition ( $10,26 \pm 2,53$ ) par rapport à l'indice calculé à 14 jours ( $11,89 \pm 2,39$ ) à la plus faible concentration de glyphosate (SNK :  $p < 0,05$ ) (Figure 6.13) (suite à un problème technique, les données de poids de chair ne sont disponibles qu'à partir de 14 jours). Cependant, aucune différence n'est observée entre les différentes concentrations à T56. Les indices AFNOR calculés pour les individus exposés au  $R_{EX}$  sont significativement plus élevés après 35 jours d'exposition quelle que

soit la concentration considérée (moyenne générale de  $12,07 \pm 2,14$ ) par rapport à ceux calculés en début d'expérimentation ( $10,55 \pm 2,62$ ) et aucune différence n'est observée entre les différentes concentrations (Figure 6.13). Des résultats différents ont été mis en évidence après exposition aux POEAs avec des individus exposés qui ne présentent pas d'indices de conditions plus élevés en fin d'expérimentation ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  :  $11,32 \pm 2,45$  ;  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  :  $11,62 \pm 2,22$  ;  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  :  $11,65 \pm 2,62$ ) par rapport à ceux calculés à T0 jours tandis que les individus témoins présentent une croissance significative dans le temps ( $12,04 \pm 1,94$ ) (Figure 6.13).

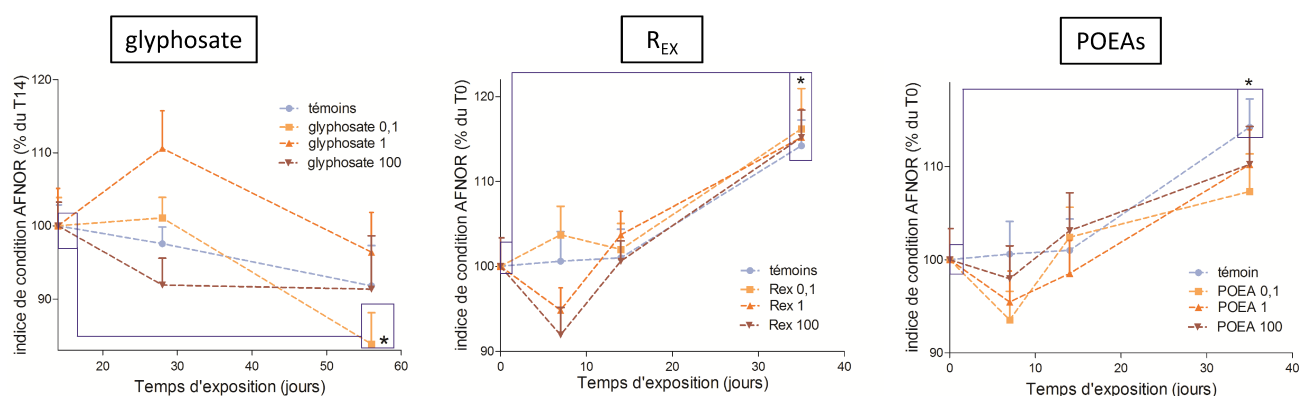


FIGURE 6.13 – Évolution de l'indice de condition AFNOR (moyennes  $\pm$  SEM) des huîtres exposées au glyphosate, Roundup Express® et POEAs. Les résultats sont exprimés en % du poids des individus au début de l'exposition (T0). Exposition au glyphosate  $\Rightarrow$  Individus témoins à T14, 28, 56 jours :  $n = 8$  ; individus par concentration à T14, 28, 56 jours :  $n = 24$ . Exposition au R<sub>EX</sub> et POEAs  $\Rightarrow$  T0, T7 jours, T14 jours :  $n = 24$  pour toutes les conditions ; T35 jours :  $n = 39$ .

### 6.3.2 Sexe et stade de gamétogenèse

Au début des deux expositions subchroniques, certains individus mis en expérience étaient toujours en repos sexuel (expérience 2012) alors que d'autres avaient déjà débuté leur cycle gamétogénétique (expériences 2012 et 2013). Ainsi à T0, les trois stades observés sont le stade 0, le stade des mitoses goniales (stade I) ou le stade II débutant. Pour les huîtres en stade I, il est difficile de se prononcer avec certitude sur le sexe de l'animal. Ainsi, par précaution et parce qu'au début de gamétogenèse des cellules germinales des deux sexes peuvent coexister avant que l'un des sexes ne prennent le pas sur l'autre, les individus en stade I ont été systématiquement placés parmi les "indéterminés". En 2012 en début d'expérience, les individus exposés au glyphosate sont à 65,52% en stade 0 et à 34,48% en stade I, le sexe ne pouvant être déterminé dans aucun cas. Pour les expositions aux R<sub>EX</sub> et POEAs (2013) à T0, les stades I et II débutant représentent 76,67% (huîtres non sexées) et 23,33%, respectivement. Les 23,33% d'huîtres

se répartissent entre 6,67% de mâles et 16,67% de femelles. Suite à l'exposition au glyphosate pendant 56 jours, tous les individus observés ont atteint le stade I, stade II débutant ou stade II avec des proportions variant, respectivement, de 68,42% ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) à 81,82% ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), de 4,55% ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) à 23,08% (témoin) et de 0 (témoin) à 10,53% ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figure 6.14 A). Aucune différence significative du stade de gamétogenèse acquis en fin d'expérience n'est enregistrée entre les divers individus témoins et exposés (Test de Fisher :  $p > 0,05$ ). Par ailleurs, les individus dont le sexe ne peut être déterminé avec certitude demeurent majoritaires (Figure 6.14 B) et les femelles et mâles observés se répartissent dans toutes les conditions.

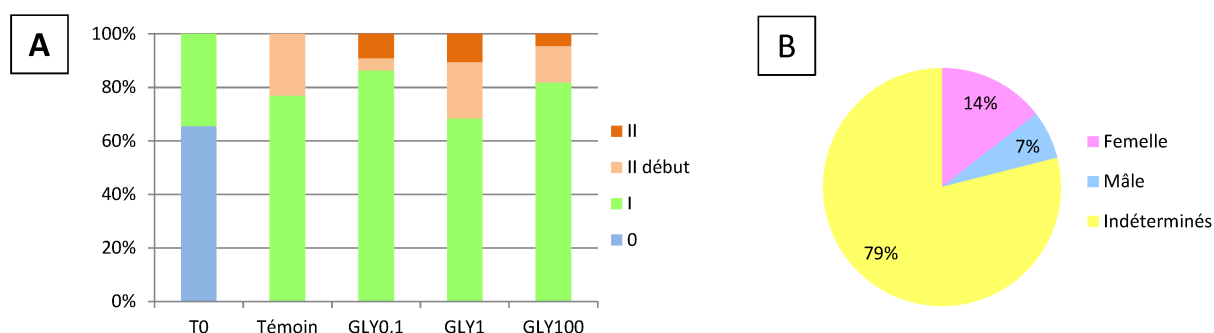


FIGURE 6.14 – Stades de développement gamétogénétique observés en début et fin d'expérience (A) et proportion d'individus mâles et femelles après 56 jours d'exposition au glyphosate pour l'ensemble des conditions (B). Pour les stades de gamétogenèse :  $13 < n < 29$ , pour le sexe ratio  $n = 76$ .

Au cours des 35 jours d'exposition aux  $R_{EX}$  ou POEAs, les huîtres poursuivent leur gamétogenèse et la proportion d'individus en stade II passe de 23,33% à 72,73% chez les individus témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 6.15 A). Après ce laps de temps et toutes conditions confondues (témoins ou différentes concentrations des substances), 44% des individus testés demeurent indéterminés sexuellement car toujours en stade I (Figure 6.15 B). Les autres individus se répartissent environ pour moitié entre le sexe mâle (27%) et le sexe femelle (29%). S'il nous apparaît difficilement concevable que les expositions appliquées dans le cadre de cette étude puissent entraîner des changements de sexe chez des animaux ayant débuté leur gamétogenèse, il est possible que ces expositions aient une répercussion sur la dynamique de la gamétogenèse. A T35 jours, les individus témoins et ceux placés aux plus fortes concentrations de  $R_{EX}$  ou POEAs sont les seuls à différer significativement des individus témoins du début d'expérience (Figure 6.15 A) avec une proportion de stades II plus importante. Cependant, lorsque l'on compare les différents pourcentages des deux types de stades (stade I *versus* stades II) calculés à T35 jours, seuls les individus exposés à  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $R_{EX}$  diffèrent signifi-

cativement de ceux placés à 0,1 et 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de POEAs et 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de  $R_{\text{EX}}$ . Ces résultats suggèreraient que le  $R_{\text{EX}}$  et les POEAs à la faible concentration (et intermédiaire pour le POEAs) tendent à ralentir le déroulement de la gamétogenèse, ce qui ne serait pas le cas des plus fortes concentrations.

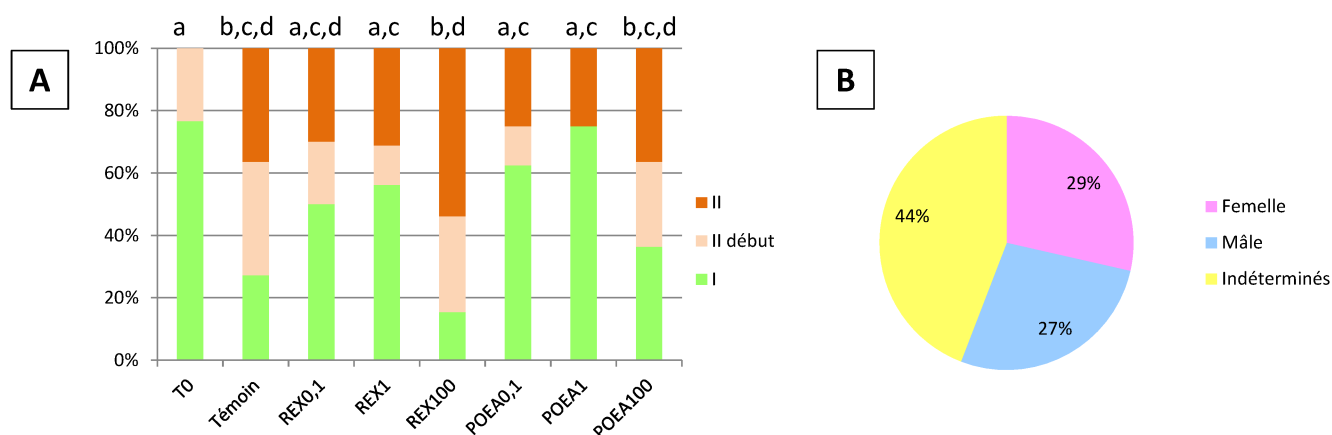


FIGURE 6.15 – Stades de développement gamétogénétique observés en début et fin d'expérience (A) et proportion d'individus mâles et femelles après 35 jours d'exposition au  $R_{\text{EX}}$  et POEAs pour l'ensemble des conditions (B). Pour les stades de gamétogenèse  $8 < n < 30$ , pour le sexe ratio  $n = 77$ . Les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à  $p < 0,05$ .

### 6.3.3 Qualité des tissus évaluée par histopathologie

Pour l'exposition au glyphosate, les atrophies de la paroi des tubules de la glande digestive et les deux altérations tissulaires (déstructuration du tissu conjonctif et infiltrations hémocytaires) observées chez les individus témoins ne présentent pas d'évolution temporelle significative (T0, T7j, T14j, T28j et T56j) (K-W :  $p > 0,05$ ). Le manque général de significativité des différences temporelles enregistrées chez les huîtres témoins ou exposées au glyphosate nous amène à ne présenter ici que les résultats histopathologiques acquis en début (T0) et fin d'expérience (T56j). En début d'expérience, les animaux placés dans les structures expérimentales présentent peu d'atrophies de la paroi de leurs tubules digestifs (valeur moyenne de  $0,67 \pm 0,11$ ) (Figure 6.16 A). Ces atrophies sont plus fréquentes et/ou plus marquées en fin d'expérience, notamment chez les individus exposés aux concentrations de glyphosate de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $1,33 \pm 0,26$ ) et 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $1,56 \pm 0,25$ ). Néanmoins, le test de Kruskal et Wallis ne révèle pas de différence significative entre conditions mais seulement une tendance ( $p = 0,065$ ). Les déstructurations du tissu conjonctif peuvent, dans une certaine mesure, refléter la quantité de réserves disponibles pour l'animal car ce tissu est formé de cellules vésiculeuses riches en glycogène. A T0, les individus mis en expérience montrent un tissu

conjonctif assez fortement déstructuré avec un indice moyen de  $2,21 (\pm 0,17)$  (Figure 6.16 B). Après 56 jours d'exposition, c'est chez les individus témoins que cet indice moyen est le plus élevé ( $2,85 \pm 0,99$ ) mais aucune différence significative n'est calculée dans le temps (T0 *versus* T56j) et entre les différentes concentrations à T56j (K-W :  $p = 0,28$ ). Avec un indice moyen de  $2,36 (\pm 0,16)$  en début d'expérience, nous pouvons considérer que l'altération la plus marquée correspond à des infiltrations hémocytaires (Figure 6.16 C). De plus, en comparaison avec T0, ces infiltrations hémocytaires sont significativement plus importantes après 56 jours d'expérience chez les huîtres exposées aux trois concentrations mais non chez les témoins (K-W :  $p > 0,01$ ) ; en revanche, nous n'observons pas d'effet dose même si c'est à la concentration de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  que l'indice moyen d'infiltrations est le plus élevé ( $3,38 \pm 0,20$ ). La glande digestive des indivi-



FIGURE 6.16 – Niveaux (moyennes  $\pm$  SEM) d'atrophies de la paroi des tubules de la glande digestive (A), de déstructurations du tissu conjonctif (B) et infiltrations hémocytaires (C) chez les huîtres à T0 et après 56 jours d'exposition au glyphosate. T0 :  $n = 33$  ; témoins :  $n = 13$  ; individus exposés :  $n = 25$ . Les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à  $p < 0,05$ .

dus destinés à l'exposition subchronique au  $R_{EX}$  et aux POEAs montre à T0 un indice moyen d'atrophie modéré ( $1,50 \pm 0,16$ ) mais néanmoins supérieurs à tous ceux qui sont calculés à T35j (Figure 6.17 A). Les atrophies apparaissent donc moins fréquentes et/ou moins marquées à la fin de l'expérience. Suite à un test de Kruskal et Wallis révélant des différences significatives ( $p < 0,01$ ), les tests post-hoc de comparaisons n'indiquent cependant de différences significatives qu'entre, d'une part, les individus témoins à T0 et, d'autre part, les huîtres placées à T35j dans les conditions suivantes : témoin ; 0,1 et  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $R_{EX}$  ;  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de POEAs.

En ce qui concerne les déstructurations du tissu conjonctif, il n'apparaît pas de tendance nette en fonction du temps (T0 *versus* T35j) ou en fonction des concentrations en contaminants (Figure 6.17 B). Le test de Kruskal et Wallis indique une différence significative ( $p = 0,021$ ) mais les tests post-hoc ne permettent pas de déterminer quels sont les groupes de conditions homogènes (toutes les valeurs de  $p$  étant supérieures à 0,05). Avec des indices moyens de  $2,81 (\pm 0,31)$  et  $3,00 (\pm 0,49)$ , les individus placés aux



concentrations intermédiaires de  $R_{EX}$  et de POEAs, respectivement, se distinguent par des déstructurations globalement plus importantes par rapport aux individus témoins à T0 et aux huîtres exposées à  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  de POEAs (indice de  $\approx 1,75$ ).

Les valeurs minimales ( $1,09 \pm 0,35$ ) et maximales ( $2,20 \pm 0,19$ ) de l'indice d'infiltrations hémocytaires sont calculées pour les individus témoins à, respectivement, T35j et T0 (Figure 6.17 C). L'éventail d'indices obtenus pour les différentes conditions permet de conclure que les huîtres sont modérément touchées par ces infiltrations (indice moyen à T35j de  $1,53 \pm 0,13$ ) et que l'exposition à l'herbicide ou aux adjuvants n'impacte pas significativement l'ampleur et/ou la fréquence de l'infiltration des tissus par les hémocytes (K-W :  $p = 0,53$ ).

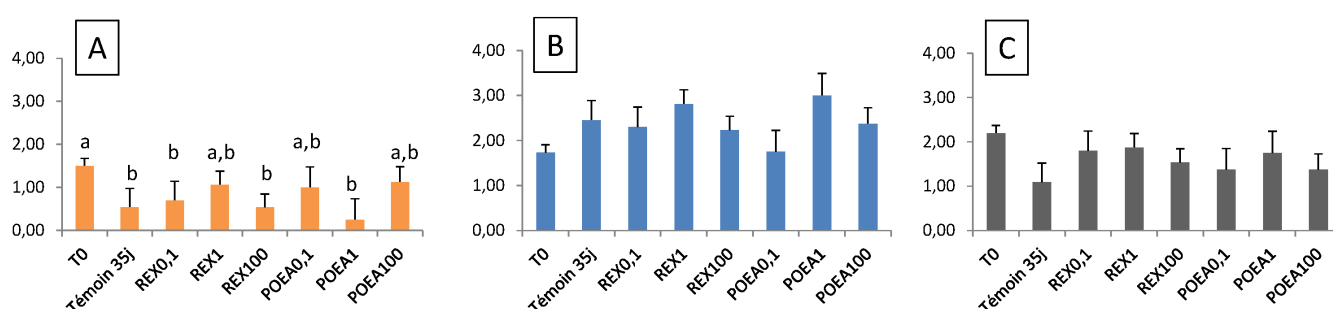


FIGURE 6.17 – Niveaux (moyennes  $\pm$  SEM) d'atrophies de la paroi des tubules de la glande digestive (A), de déstructurations du tissu conjonctif (B) et infiltrations hémocytaires (C) chez les huîtres en début (T0) et après 35 jours d'exposition au  $R_{EX}$  et au POEAs. T0 :  $n = 29$  ; témoins :  $n = 10$  ; individus exposés :  $7 < n < 15$ . Les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à  $p < 0,05$ .

### 6.3.4 Activités des GSTs et des catalases ; peroxydation lipidique

Les activités des GSTs, et des catalases ainsi que le niveau de peroxydation lipidique ont été étudiés lors de l'exposition aux  $R_{EX}$  et POEAs. Cependant, suite à un problème technique (panne d'un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ ), seuls les résultats de 0 à 14 jours d'exposition sont disponibles. Pour toutes les concentrations de  $R_{EX}$  testées, l'activité catalase n'est pas significativement différente à un temps donné et aucune évolution temporelle n'a été enregistrée (Figure 6.18 A). L'activité moyenne des individus témoins à T0 est de  $293,6 \text{ U/mg}$  de protéines ( $\pm 46,54$ ) et celle-ci varie peu sur toute la durée de l'expérimentation (24h :  $259,17 \pm 29,77$  ; 7 jours :  $270,4 \pm 95,65$  ; 14 jours :  $293,0 \pm 50,90$ ). Les valeurs moyenne extrêmes sont enregistrées pour les concentrations de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $R_{EX}$  à 24h ( $415,1 \pm 127,4$ ) et de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $R_{EX}$  à 7 jours ( $204,2 \pm 38,88$ ). Après exposition au  $R_{EX}$  l'activité des GSTs n'a également pas montré d'évolution temporelle ou par concentration pour une date donnée (ANOVAs :  $p > 0,05$ ) et les valeurs

extrêmes de  $\Delta$  D.O./min/ mg de protéines sont enregistrées pour les concentrations de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  à 24h ( $21,10 \pm 5,3$ ) et  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  à 7 jours ( $8,80 \pm 1,54$ ) (Figure 6.18 A). Peu de différences sont notées au niveau de la concentration en MDA seule la valeur enregistrée pour la concentration de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $R_{\text{EX}}$  ( $1,12 \pm 0,12$ ) est significativement plus faible (K-W :  $p < 0,05$ ) de celles enregistrées à 24h ( $1,91 \pm 0,14$ ) et 14 jours d'exposition ( $1,67 \pm 0,18$ ) (Figure 6.18 A). L'exposition aux POEAs n'a pas révélé de différence significative de l'activité catalase entre concentrations pour un temps donnée (ANOVAs :  $p > 0,05$ ) ; cependant pour la concentration de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , une baisse significative est notée à 7 jours ( $182,6 \pm 20,31$ ) par rapport aux valeurs enregistrées à 24h ( $339,6 \pm 50,63$ ) et 14 jours ( $307,7 \pm 39,68$ ) (Figure 6.18 B). L'activité des GSTs n'est pas significativement différente entre concentrations pour un temps donné après exposition aux POEAs (ANOVAs :  $p > 0,05$ ) mais à nouveau des différences significatives sont notées pour la concentration de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  entre les différentes dates. En effet, pour cette concentration, une augmentation est observée après 7 jours d'exposition ( $27,58 \pm 3,03$ ) par rapport à 24h ( $12,84 \pm 2,68$ ) et 14 jours ( $10,25 \pm 1,9$ ) (Figure 6.18 B). la quantité de MDA n'est pas différente lorsque les échantillons exposés au POEAs sont comparés à une date donnée (K-W :  $p > 0,05$ ), mais des différences dans le temps apparaissent pour la concentration de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  de POEAs qui présente des concentrations en MDA significativement plus faibles à 7 jours ( $1,21 \pm 0,06$ ) que celles enregistrées à 24h ( $2,30 \pm 0,31$ ).

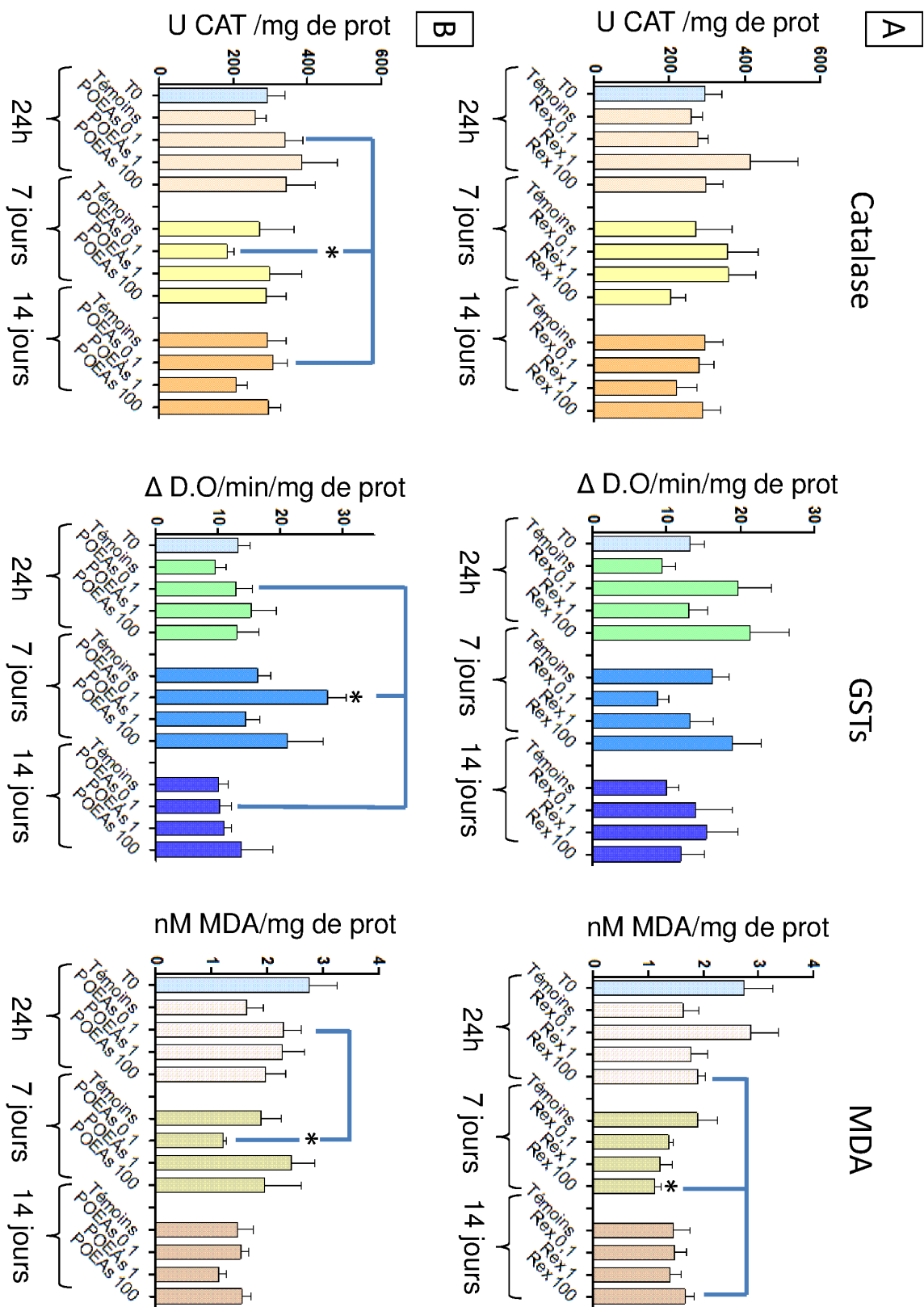


FIGURE 6.18 – Activités des catalases et GSTs et niveaux de MDA (moyennes  $\pm$  SEN) chez les individus à T0, T24h, T7 jours et T14 jours après exposition aux Rex et POEAs. Activités catalases et GSTs : n= 6 pour chaque condition. MDA : n= 5.

### 6.3.5 Mesure de l'expression transcriptionnelle de gènes ciblés évaluée par RT-PCR

L'expression des gènes pris en compte est rapportée à celle de 3 gènes de références. Les ARNm de référence sont l'actine, la GAPDH et l'ARN ribosomal 18S. Les résultats présentés dans cette partie concernent les gènes pour lesquelles une réponse comparable est observée pour les trois gènes de références et le lecteur trouvera l'ensemble des résultats en annexe B. L'ensemble des données d'expression des gènes est représenté sous la forme de boîtes à moustaches : les extrémités du rectangle représentent le premier et troisième quartiles ; le trait médian est utilisé pour figurer la médiane ; la moyenne est représentée par le symbole "+" et les extrémités des "moustaches" correspondent aux valeurs minimales et maximales. Pour l'ensemble des données présentées dans cette partie, le niveau d'expression observé à T0 n'est jamais différent de celui observé pour le groupe témoin aux différentes dates d'étude.

Après 24h d'exposition, une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour les métallothionéines (MT 1 & 2) est observée pour la plus forte dose de glyphosate indépendamment du gène de référence considéré (Figure 6.19 A). Après 7 jours d'expositions au glyphosate, le même type de résultat est constaté (Figure 6.19 B). Cependant, seuls les résultats correspondant à la normalisation par la GAPDH montrent une différence significative des témoins avec les individus exposés à la plus forte concentration en glyphosate tandis qu'une tendance est observée pour les données normalisées par l'actine et l'ARN 18S (Figure 6.19 B). L'expression des MT1 & 2 après 14 jours d'exposition reste très proche de celle observée à 7 jours. Bien qu'une augmentation de l'expression soit notée à 100  $\mu\text{L}^{-1}$  quel que soit le gène de référence considéré, celle-ci n'est significative que pour les résultats normalisés par la GAPDH (Figure 6.19 C).

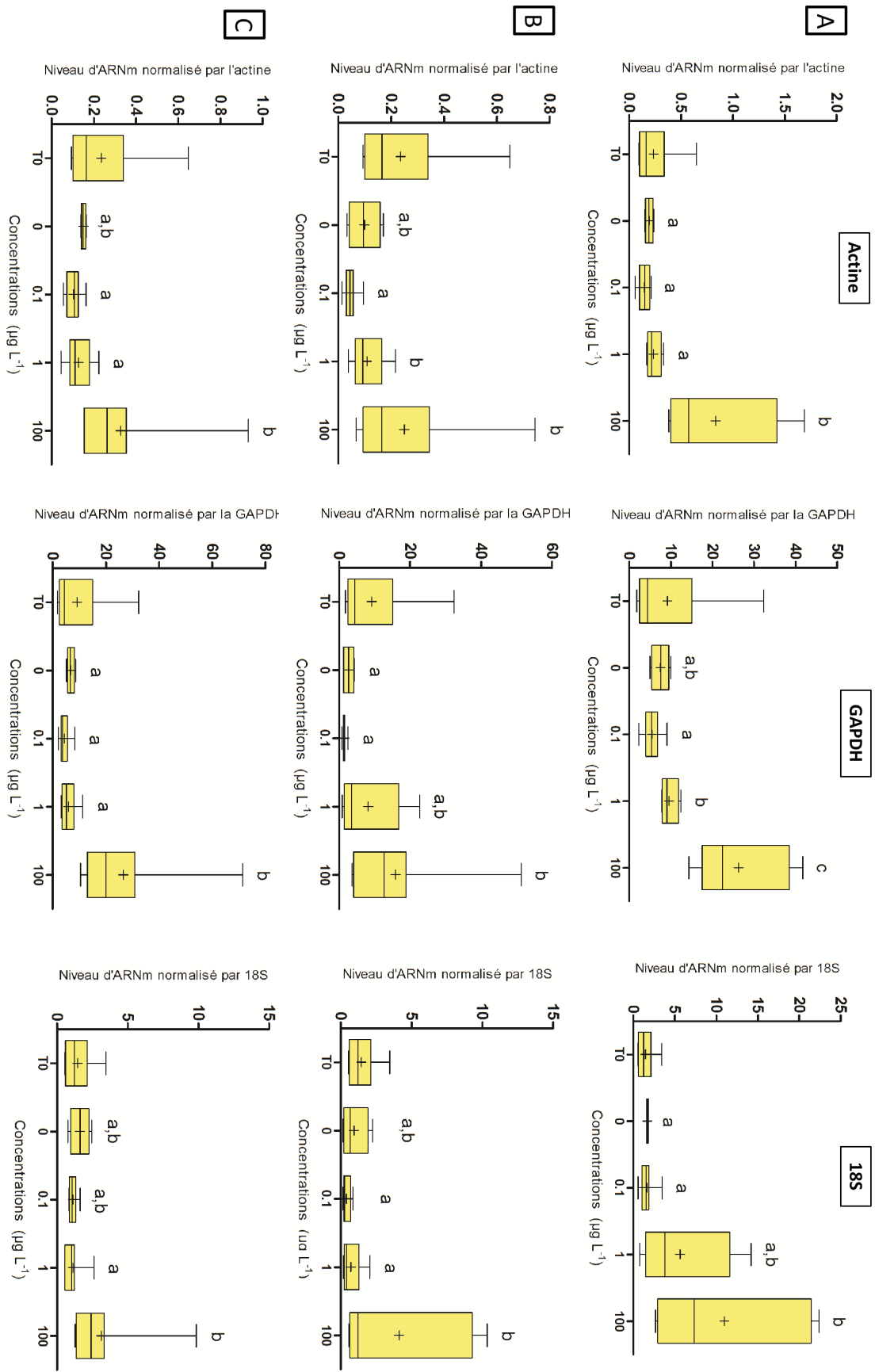


FIGURE 6.19 – Niveaux d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les MT1 & 2 après 24h (A), 7 jours (B), 14 jours (C) d'exposition au glyphosate et pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins n= 4, exposés n= 8. La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à  $p < 0,05$ .

Après 24h d'exposition et indépendamment du gène utilisé pour la normalisation des données, le niveau d'expression transcriptionnelle du gène codant pour la GST est significativement plus important chez les individus exposés à la plus forte dose de glyphosate par rapport à toutes les concentrations testées (ANOVAs :  $p < 0,05$ ) (Figure 6.20). Cependant, il est à noter cette augmentation n'est pas observée aux autres dates de prélèvement (annexe B).

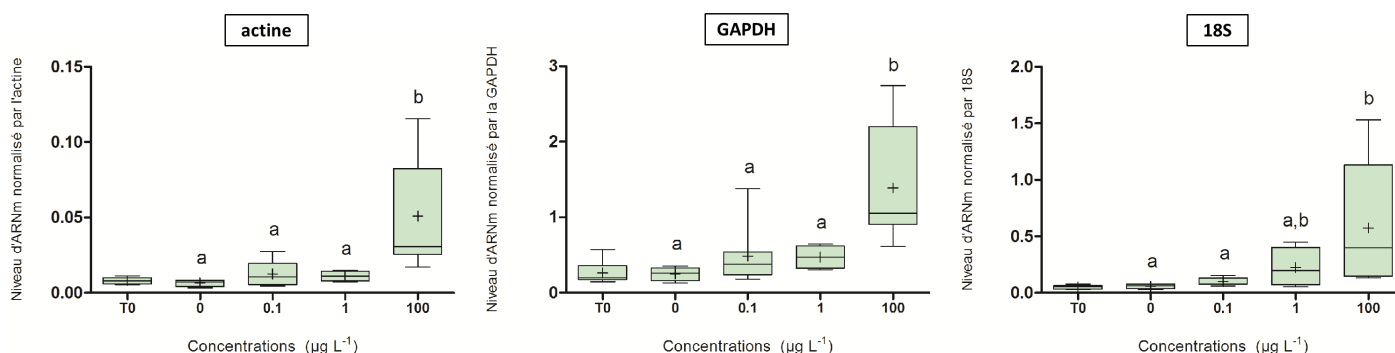


FIGURE 6.20 – Niveaux d'expression transcriptionnelle du gène codant pour la GST après 24h d'exposition au glyphosate pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins  $n=4$ , exposés  $n=8$ . La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à  $p < 0,05$ .

Les niveaux d'ARNs correspondant à la MXR augmentent significativement chez les huîtres après 28 jours d'exposition au glyphosate (ANOVAs et K-W :  $p < 0,05$ ) (Figure 6.21). Pour les données normalisées par l'actine et la GAPDH, cette augmentation est observée pour toutes les concentrations d'herbicide testées alors qu'elle apparaît moins marquée pour les données normalisées par l'ARN 18S. Les niveaux d'expression observés pour les huîtres avant le début de l'exposition sont élevés (T0), et ne sont pas significativement différents de ceux enregistrés pour les témoins après 28 jours d'exposition.

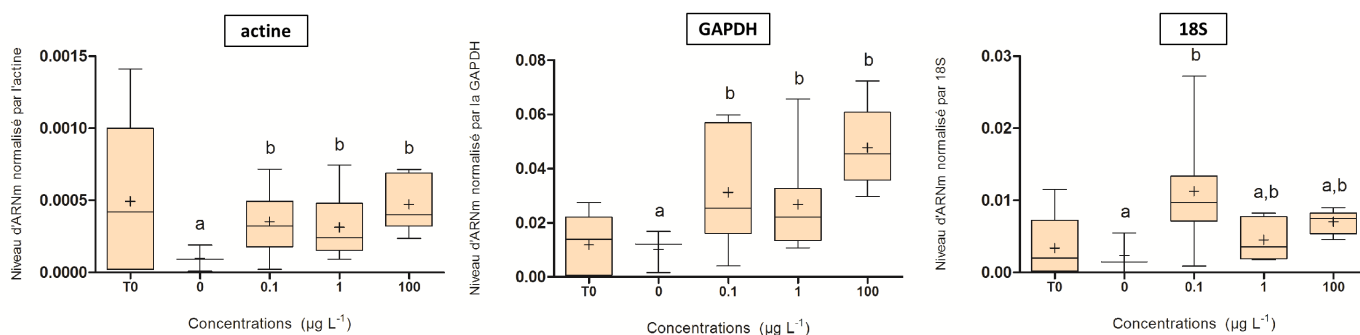


FIGURE 6.21 – Niveaux d'expression transcriptionnelle du gène codant pour la MXR après 28 jours d'exposition au glyphosate pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins  $n=4$ , exposés  $n=8$ . La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à  $p < 0,05$ .

Les données concernant les messagers codant pour la protéine chaperonne HSC72 indiquent une baisse de l'expression après 28 jours d'exposition au glyphosate. Cette baisse non significative chez les individus exposés à  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  le devient pour les individus exposés à la plus forte dose de glyphosate et lorsque les données sont normalisées par la GAPDH et l'ARN 18S. Bien qu'une tendance à la baisse des niveaux de l'expression transcriptionnelle soit observée pour les données normalisées par l'actine, celle-ci n'est pas significative.

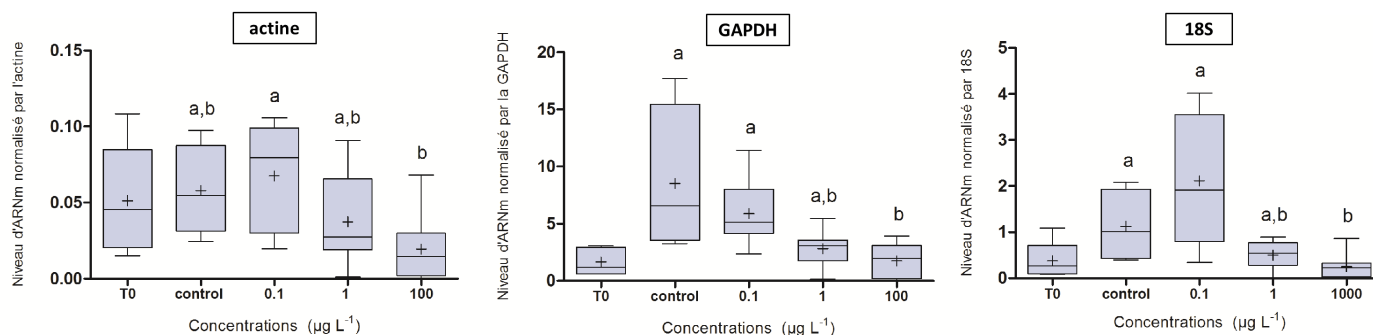


FIGURE 6.22 – Niveaux d'expression transcriptionnelle du gène codant pour la HSC72 après 28 jours d'exposition au glyphosate pour les trois gènes de référence : actine, GAPDH et 18S. Témoins  $n=4$ , exposés  $n=8$ . La significativité des différences est testée avec des ANOVAs ou des Kruskal & Wallis et les groupes qui ne partagent pas de lettres sont significativement différents à  $p < 0,05$ .

## 6.4 Discussion

### 6.4.1 Concentrations des molécules dans les structures expérimentales

Durant les deux expérimentations subchroniques, il n'a pas été possible d'analyser les concentrations en polluants et l'ensemble des concentrations sont donc données en tant que concentration nominales. Cependant, lors d'expérimentations préliminaires, des analyses de glyphosate ont été réalisées juste après dopage de 14 litres d'eau de mer puis après 24h d'incubation dans des bacs en polypropylène similaires. Peu de différences ont été observées entre les concentrations nominales et les concentrations mesurées et les doses ne se sont pas révélées diminuées après 24h d'expérimentation, ce qui exclut une hydrolyse ou une photolyse notables (Tableau 6.5). De même, les analyses de glyphosate et de Roundup Express® effectuées lors de l'exposition des larves véligères D et pédivéligères montrent la relative stabilité des concentrations après 24 ou 36h d'incubation dans l'eau de mer. S'il n'a pas été possible de mesurer les concentrations en adjuvants dans l'eau de mer pour en appréhender le comportement, certains auteurs font part de la stabilité des formulations de POEAs dans les environnements aquatiques. Ainsi, Giesy et al. (2000) rapportent une demi-vie aquatique comprise entre 21 et 42 jours pour le mélange de POEAs classiquement utilisé dans les formulations commerciales de Roundup® (MON 0818, Monsanto). Les différentes analyses suggèrent que les concentrations en glyphosate dont celle contenue dans la formulation commerciale (R<sub>EX</sub>) sont restées stables entre deux changements complets de milieu (48h).

TABLE 6.5 – Concentrations en glyphosate dans les bacs d'eau de mer lors d'expérimentations préliminaires en début d'expérimentation et après 24h d'incubation.

Concentrations nominales	0 µg L <sup>-1</sup> (témoins)	0,1 µg L <sup>-1</sup>	1 µg L <sup>-1</sup>	10 µg L <sup>-1</sup>
T0	<0,05 µg L <sup>-1</sup>	0,06 µg L <sup>-1</sup>	0,87 µg L <sup>-1</sup>	9,15 µg L <sup>-1</sup>
T24h	<0,05 µg L <sup>-1</sup>	0,08 µg L <sup>-1</sup>	0,99 µg L <sup>-1</sup>	9,79 µg L <sup>-1</sup>

### 6.4.2 Niveaux d'expression des gènes ciblés

La modification de l'expression de gènes est un des premiers niveaux de la réponse des organismes face à une contamination. Afin d'en étudier les variations, il a été choisi d'étudier l'expression de certains gènes ciblés pouvant potentiellement être impactée par l'exposition au glyphosate. Les différents gènes choisis codent pour des protéines chaperonnes ou sont donc impliqués dans des fonctions de détoxification, de régulation du stress oxydatif et de régulation du cycle cellulaire. La technique de RT-PCR



choisie pour étudier l'expression de ces gènes présente certains avantages en termes de sensibilité (faible quantité d'ARN nécessaire), de précision dans la détection de différences entre échantillons et de reproductibilité. De possibles biais peuvent cependant être évoqués concernant cette technique, notamment l'utilisation de gènes de référence ou gènes « house-keeping ». Les gènes de référence possèdent normalement une expression constante car ils codent pour des protéines qui interviennent dans des mécanismes indispensables à la survie des cellules (Thellin *et al.*, 1999). Bien qu'une première étape de normalisation soit effectuée au moment du dosage des ARNs, l'expression de ces gènes est utilisée pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt. Plusieurs études font cependant état de variations de l'expression des gènes de référence car les protéines pour lesquelles ils codent ne sont pas seulement impliquées dans le métabolisme basal mais participent également à d'autres fonctions (Thellin *et al.*, 1999). Dans sa thèse, Gagnaire (2005) rapporte ainsi des variations des gènes de référence (18S, actine) pendant exposition d'huîtres à un mélange de 8 pesticides dont le glyphosate. De même, Tanguy *et al.* (2005b) font état de variations de l'expression de l'actine après une exposition longue d'huîtres au glyphosate ou à un mélange de pesticides. L'étude menée par Du *et al.* (2013) s'est intéressée à la variation de l'expression des gènes de référence pendant le développement larvaire de *C. gigas* en absence ou en présence du virus OsHV-1. Ces auteurs ont montré que l'expression des gènes de référence classiquement utilisés tels que les ARNs 18S et 28S, l'actine, la GAPDH et le facteur d'élongation (EF alpha 1) n'est pas stable. Ces auteurs préconisent d'utiliser les gènes RL7 et RS18 qui appartiennent à la grande et petite sous-unité ribosomale et dont l'expression serait la plus stable.

Lors de ce travail, certaines variations sont apparues lorsque les valeurs brutes de Ct sont comparées dans le temps (*données non illustrées*). Des différences sont enregistrées pour les trois concentrations de glyphosate pour l'actine, pour les deux plus fortes concentrations pour la GAPDH et seulement pour la concentration de 1 µg L<sup>-1</sup> pour l'ARN 18S. De plus, les témoins ne présentent pas de variation dans le temps et aucune différence n'est apparue lorsque l'expression des gènes de référence est comparée à une date donnée. Les variations enregistrées ne remettent pas en cause la validité des résultats obtenus puisque les résultats sont comparés par date et que l'utilisation de trois gènes de références nous permet de ne sélectionner que les résultats présentant la même tendance pour les trois gènes de référence utilisés. Le choix des gènes de référence reste cependant primordial et doit être fait *a priori* en utilisant des méthodes

d'analyse spécifique (ex : GeNorm®) pour étudier la stabilité de l'expression de ces gènes.

En dépit des possibles biais pré-cités, les résultats obtenus lors de l'étude de l'expression des gènes ciblés donnent des informations importantes sur l'effet de la contamination chronique par le glyphosate. Comme le suggère l'augmentation significative de l'expression de la GST, des mécanismes précoces semblent être mis en place dès 24h d'exposition. De plus, l'augmentation de l'expression de la GST enregistrée pour la plus forte concentration de glyphosate est concomitante avec celle observée pour les métallothionéines 1 et 2. L'augmentation de l'expression de la GST peut être considérée comme la mise en place d'un système de défense par les cellules des individus exposés afin d'éliminer le glyphosate. Cette augmentation de l'expression des GSTs chez des huîtres exposées au glyphosate a déjà été notée par Boutet *et al.* (2004) qui ont montré une expression spécifique du temps d'exposition et de l'organe considéré. Ces auteurs concluent que l'expression des GSTs pi et sigma peut constituer un bon biomarqueur de l'exposition à des pesticides. L'homologue de la GST ciblée dans ce travail correspond à la GST de la classe sigma (sous-classe pi), ce qui semble en accord avec les résultats observés par Boutet *et al.* (2004). L'augmentation significative de l'expression des GSTs observée dans cette étude pour la plus forte concentration n'a pas été notée pour les temps supérieurs à 24h. On peut émettre l'hypothèse que d'autres mécanismes de défense ont été mis en place après 24h pour participer à la détoxification du glyphosate. Par exemple, une augmentation significative de l'expression des métallothionéines est enregistrée à 24h, 7 jours et, dans une moindre mesure, à 14 jours d'exposition. Ces protéines, impliquées dans de nombreux mécanismes, jouent un rôle important dans la séquestration des métaux lourds mais également dans la détoxification des xénobiotiques et dans la régulation du stress oxydant (Roesijadi *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1999; Leung et Furness, 2001). L'induction transcriptionnelle des métallothionéines a été notée chez les bivalves par divers auteurs : Devos *et al.* (2012) après l'exposition chronique de larves d'huîtres à du zinc ; Fang *et al.* (2013) après exposition de *Macraa veneriformis* à du cadmium et du mercure pendant 7 jours et Ivanković *et al.* (2010) chez des dreissenes exposées à du cadmium pendant une période d'une semaine. L'induction des métallothionéines a aussi été montrée après exposition à certaines classes de pesticides. Ainsi, Ceyhun *et al.* (2012) et Erdoğan *et al.* (2011) ont mis en évidence l'induction transcriptionnelle des métallothionéines MT-A et MT-B après exposition de truites (*Oncorhynchus mykiss*) à la deltaméthrine (un insecticide) et au di-

chlorvos (acaricide), pendant 21 et 30 jours, respectivement.

Après 28 jours d'exposition, les statistiques indiquent que deux gènes sont différemment exprimés dans nos échantillons. Le premier correspond à la protéine chaperonne HSC72 (Heat Shock Cognate) dont l'expression transcriptionnelle est significativement plus basse chez les individus exposés à la plus forte dose de glyphosate par rapport aux individus témoins. L'ADNc codant pour cette protéine a été décrit par Gourdon *et al.* (2000) et ces auteurs rapportent que les niveaux d'expression transcriptionnelle du gène correspondant ainsi que l'induction protéique peuvent augmenter après un choc thermique. L'interprétation de la baisse de l'expression de HSC72 reste difficile notamment parce que les niveaux des témoins à T0 sont très proches de ceux observés pour la concentration de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de glyphosate. Le second gène qui est exprimé différemment après 28 jours d'exposition au glyphosate est celui qui code pour les protéines du système MXR (Multi Xenobiotic Resistance) dont l'équivalent, chez les mammifères, est le système MDR (Multi Drug Resistance). Chez les mammifères, le produit des gènes MDR correspond à une protéine membranaire glycosylée, la P-glycoprotéine (Pgp) qui peut transporter une grande variété de composés aux propriétés différentes (Endicott et Ling, 1989). Le système MXR est considéré comme un mécanisme de défense faisant partie de la réponse générale face aux contaminants organiques (Eufemia et Epel, 1998). La revue réalisée par Pain et Parant (2003) rapporte l'induction protéique du système MXR chez des mollusques marins (*M. edulis* et *C. gigas*) par de nombreux composés et, notamment, le chlorthal-diméthyl (herbicide) ou le DDE, un dérivé de fabrication de l'insecticide DDT.

En plus des résultats concernant des gènes ciblés, d'autres méthodes comme la SSH permettent d'analyser les transcrits différentiellement exprimés entre des échantillons témoins et des échantillons ayant subi un traitement spécifique. L'exposition d'huîtres pendant 30 jours à un mélange d'herbicides (atrazine : 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , diuron : 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  et isoproturon : 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ou au glyphosate seul a montré que certains gènes sont régulés par l'exposition à ces molécules (Tanguy *et al.*, 2005b). Ceux-ci peuvent être assignés à des fonctions cellulaires physiologiques telles que la détoxification des xénobiotiques, la régulation de la transcription et du cycle cellulaire, la respiration et la communication cellulaires, la production et la maintenance du cytosquelette et enfin le métabolisme énergétique. Il est intéressant de noter que davantage de gènes seraient exprimés différentiellement chez les individus exposés au mélange de pesticides par rapport à ceux soumis au glyphosate seul. En se basant sur la technique de SSH, Collin *et al.* (2010)

indiquent que l'exposition d'huîtres à un mélange de lindane, de métolachlore et de carbofuran induit un stress oxydant entraînant la régulation du métabolisme du fer pour la détoxification et la protection des cellules chez les individus exposés. Cependant, lorsque les niveaux d'expression des différents gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant et de l'homéostasie du fer sont suivis par RT-PCR, il n'apparaît aucune régulation claire, soulignant ainsi un faible effet-dose.

Les résultats obtenus après l'exposition au glyphosate et les données de la littérature montrent qu'un ensemble de mécanismes semblent se mettre en place au niveau moléculaire lors de l'exposition des juvéniles d'huîtres à cet herbicide. Il faut cependant rester prudent dans l'interprétation des résultats qui peuvent être influencés par de nombreux facteurs tels que la période de l'année à laquelle l'étude a été effectuée. Par exemple chez *C. gigas*, Farcy *et al.* (2007) ont enregistré des variations importantes de l'expression de certains gènes (MT, HSP90, HSP70, SOD) en fonction de la période de prélèvement et de la température du milieu. Les modifications du niveau d'expression des gènes sont généralement considérées comme des réponses précoces face à une contamination. Bien que des différences aient été observées entre les huîtres exposées aux différentes concentrations de glyphosate et les huîtres témoins, il se peut que l'augmentation ou la baisse des transcrits aient lieu à des temps d'exposition différents de ceux auxquels les individus ont été prélevés et étudiés. De plus, les inductions ou baisses du nombre de transcrits observées sont généralement de faible amplitude et nécessiteraient d'être confirmées au niveau des protéines (par ELISA ou WESTERN blot).

#### 6.4.3 Activités enzymatiques et peroxydation lipidique

Les activités enzymatiques enregistrées pour les témoins restent stables dans le temps, ce qui suggère que les conditions d'expérimentation n'ont pas induit de stress particulier. Peu de différences ont été enregistrées au niveau des activités catalase et GST lors de l'exposition des huîtres aux R<sub>EX</sub> et POEAs. Au niveau des catalases, seules les huîtres exposées à la plus faible concentration d'adjuvants présentent des différences temporelles avec une baisse significative à 7 jours tandis que pour l'activité des GSTs, l'inverse est observé avec une augmentation relativement importante.

Les catalases (CAT) correspondent à une famille d'enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant et plusieurs études rapportent l'augmentation de l'activité de ces enzymes après exposition à des contaminants. Ainsi, Funes *et al.* (2006) ont noté

l'augmentation de l'activité CAT chez des huîtres transplantées le long d'un gradient de pollution métallique. Wang *et al.* (2010) rapportent l'augmentation de cette activité chez les larves D de *Meretrix meretrix* exposées à du cadmium. Alves *et al.* (2002b) ont enregistré une augmentation significative de l'activité CAT chez l'huître des mangroves, *C. rhizophorea*, soumises pendant 96h à 0,1 mg L<sup>-1</sup> de carbofuran (insecticide carbamate) tandis que Damiens *et al.* (2004) rapportent une augmentation de cette même activité après exposition de larves d'huître *C. gigas* à partir de la même dose de carbofuran. L'étude conduite par Damiens *et al.* (2004) fournit des résultats très intéressants car lors de l'exposition d'un second lot de larves aux mêmes concentrations en carbofuran, une réponse inverse est enregistrée avec une baisse significative de l'activité CAT suggérant que les différences génétiques entre animaux peuvent considérablement changer leur réponse aux contaminants. Dans le présent travail, la baisse de l'activité CAT observée après 7 jours d'exposition des juvéniles d'huîtres à 0,1 µg L<sup>-1</sup> de POEAs pourrait correspondre à une inhibition des systèmes de défense contre le stress oxydant. L'inhibition de l'activité CAT a par ailleurs été décrite par Greco *et al.* (2011) chez *Mya arenaria* ; les résultats de cette étude montrent une inhibition de l'activité CAT après 28 jours d'exposition à 10 µg L<sup>-1</sup> d'une formulation commerciale à base de 2-4 D, mecoprop et dicamba. L'exposition au R<sub>EX</sub> n'a pas provoqué de changements significatifs de l'activité des CATs. Il est intéressant de noter que des individus de moule dorée (*Limnoperna fortunei*) exposés à de fortes concentrations de glyphosate (jusqu'à 6000 µg L<sup>-1</sup>) n'ont pas présenté de changement de l'activité CAT par rapport aux individus témoins après 28 jours (Iumamoto *et al.*, 2013). Le système anti-oxydant impliquant différentes enzymes, il aurait été intéressant en complément de mesurer l'activité d'enzymes autres que les catalases telles que la SOD ou encore les glutathion peroxydases (GPx).

Lorsque les résultats relatifs à l'activité des GSTs pour les deux contaminants sont comparés à une date donnée, aucune différence significative n'est enregistrée. Cependant, la réponse temporelle des huîtres concernant l'activité des GSTs chez les individus exposés à la plus faible concentration de POEAs apparaît inversement proportionnelle à celle enregistrée pour la CAT et une augmentation significative de l'activité des GSTs est enregistrée après 7 jours d'exposition. Ce résultat est comparable aux données rapportées par différentes études ; en effet, l'augmentation de l'activité des GSTs a, par exemple, été montrée chez des larves de *C. gigas* exposées au carbofuran (Damiens *et al.*, 2004), chez des huîtres *C. rhizophorea* exposées à de l'huile de diesel (da Silva

*et al.*, 2005), chez des huîtres *C. angulata* soumises sur le terrain à un gradient de pollution métallique (Funes *et al.*, 2006) et chez des moules de *L. fortunei* exposées pendant 28 jours à du glyphosate (Iummato *et al.*, 2013). L'étude de Contardo-Jara *et al.* (2009) menée sur le lombric *Lumbriculus variegatus* montre des résultats proches de ce qui a été enregistré dans notre travail puisque ces auteurs ont observé une augmentation significative de l'activité pour les GSTs mais non pour les CATs lors d'une exposition au glyphosate.

Le taux de malondialdéhyde (MDA) est un bon marqueur du stress oxydant. En effet, il est le produit terminal de l'action des DROs sur les acides gras polyinsaturés. L'exposition aux  $R_{EX}$  et POEAs n'a pas provoqué de changements significatifs du niveau de MDA entre les différents individus et le niveau de peroxydation lipidique des huîtres exposées n'est pas apparu plus élevé que celui des huîtres témoins. Au contraire, l'examen de l'évolution temporelle du niveau de MDA indique que les individus exposés à la plus forte dose de  $R_{EX}$  et la plus faible dose de POEAs présentent des concentrations en MDA significativement plus basses à 7 jours par rapport à T24h pour les deux molécules et également T14 jours pour le  $R_{EX}$ . Pour les individus exposés au  $R_{EX}$  comme aux POEAs, cette baisse de la peroxydation lipidique intervient à la concentration à laquelle l'activité des GSTs est la plus importante (même si celle-ci n'est pas significativement plus élevée dans le cas de l'exposition au  $R_{EX}$ ). Dans la littérature, cette baisse de la peroxydation lipidique est souvent associée à l'augmentation de l'activité ou de l'expression des CATs qui correspondent à une famille d'enzymes clefs de la régulation du stress oxydant (Funes *et al.*, 2006; Damiens *et al.*, 2007; Canesi *et al.*, 2008). Outre la catalase, les systèmes de défense contre le stress oxydant font appel à des enzymes comme la SOD et les GPx déjà évoqués mais également à des systèmes non enzymatiques comme des protéines (métallothionéines) ou d'autres types de molécules (dérivés d'acides aminés tels que la taurine ou le glutathion total) (Funes *et al.*, 2006). Ces différents systèmes n'ont pas été mesurés dans ce travail mais ils pourraient présenter une augmentation aux concentrations de  $R_{EX}$  et de POEAs auxquelles les niveaux de MDA sont les plus faibles.

#### 6.4.4 Reproduction : stades de gamétogenèse

Les stades de gamétogenèse sont déterminés à partir de coupes histologiques avec un effectif par date et concentration compris entre 8 et 30 individus, ces chiffres dépendant du nombre d'huîtres restant en fin d'expérience pour ce type de biomarqueur.

Si un effectif de 30 est satisfaisant, les plus faibles effectifs nous incitent à considérer les résultats avec précaution. En début d'expérimentation (11 avril 2012 et 29 avril 2013), l'avancement de la gamétogenèse des différents lots d'huîtres est globalement cohérent avec les stades observés chez de jeunes huîtres à la même période dans le milieu naturel (Royer *et al.*, 2008). Nous remarquons néanmoins que pour l'exposition au glyphosate en 2012, la proportion d'individus en repos sexuel (stade 0) est relativement élevée. Après 56 jours d'exposition au glyphosate, aucune différence n'est notée entre les individus témoins et ceux exposés aux trois concentrations et le glyphosate ne semble donc pas entraîner un retard dans le déroulement de la gamétogenèse. De plus, si nous considérons uniquement les individus en stade de développement gonadique (stades II et II début), nous observons au contraire que la faible proportion d'individus les plus avancés dans la gamétogenèse (stade II) est calculée pour les individus exposés, notamment à  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de glyphosate. Chez des adultes de *C. gigas* exposés à du diuron ou à un mélange de 4 pesticides pendant 7 jours, Buisson et ses collaborateurs (2008) ont enregistré une accélération des processus de maturation et une stimulation de la ponte à partir de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  du mélange et  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de diuron. Bien que cette étude concerne des individus plus âgés (poids moyen de 16 g), les résultats se rapprocheraient de ceux que nous obtenons avec le glyphosate, notamment la concentration de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  où une tendance à l'accélération de la gamétogenèse est observée sans que les processus sous-jacents soient connus.

Les résultats acquis pour la formulation commerciale de glyphosate et les adjuvants ne vont pas dans le même sens que les données enregistrées pour le glyphosate ou lors de l'étude de Buisson *et al.* (2008). En effet, aucune différence significative n'étant notée avec les huîtres en début d'expérience (T0), l'exposition aux faibles doses ( $0,1$  et  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de R<sub>EX</sub> et POEAs semblent provoquer un retard de la gamétogenèse des juvéniles. Cependant, l'effet est peu marqué car après 35 jours d'exposition, seules les huîtres soumises à la concentration de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de R<sub>EX</sub> diffèrent significativement des individus exposés aux concentrations faibles (POEAs) ou intermédiaires (R<sub>EX</sub> et POEAs). Il serait intéressant de poursuivre ces travaux avec un plus grand nombre d'individus de façon à confirmer (ou infirmer) que les doses faibles et intermédiaires ( $0,1$  et  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en R<sub>EX</sub> et POEAs seraient plus néfastes à la reproduction des huîtres que la dose de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Si tel était le cas, cela pourrait avoir des répercussions sur la pérennité des populations naturelles. L'effet du Roundup sur la gamétogenèse est rapporté par Howe *et al.* (2004) chez des espèces d'amphibiens exposées à différentes formulations de glyphosate. Ainsi, ces auteurs relèvent un effet délétère sur la repro-

duction avec une augmentation de la fréquence des gonades présentant des anomalies telles que des ovocytes atrétiques, des proliférations anormales des ovogonies ou encore des phénomènes d'intersex. Des dégénérescences ovocytaires et des retards de gamétogenèse constatés chez des moules zébrées dans un lac italien ont été attribués à des interférences neuroendocrines du DDT avec la reproduction des moules (Binelli *et al.*, 2001).

#### 6.4.5 Histopathologie

Les analyses histopathologiques ont révélé que lors des deux expositions, le tissu conjonctif des huîtres présente des déstructurations assez importantes en début d'expérimentation. Les individus possèdent relativement peu de tissu de réserve (riche en glycogène) et l'état physiologique n'apparaît donc pas optimal. En Normandie, des déstructurations tissulaires avec de larges lacunes sont généralement observées pendant la période hivernale ou au début du printemps, lorsque le niveau trophique est bas (Costil, *com pers.*). Le degré de développement du tissu conjonctif est donc cohérent pour des individus qui n'ont pas pu bénéficier du bloom phytoplanctonique printanier. Il est à noter que les conditions expérimentales n'ont pas permis aux huîtres de reconstituer leur tissu de réserve puisque les indices moyens de déstructuration après 56 jours (exposition au glyphosate) ou 35 jours (expositions aux  $R_{EX}$  et POEAs) ne diffèrent pas significativement. En effet, l'indice de déstructuration stagne ou augmente de façon non significative au cours du temps. Ce phénomène pourrait être expliqué par un apport de nourriture insuffisant et/ou par une résorption des réserves du tissu conjonctif afin de fournir de l'énergie pour la réalisation de la gamétogenèse. Pour les deux expérimentations, les coupes histologiques ont révélé des atrophies de la paroi des tubules digestifs globalement faibles ou modérées (indices maximum de l'ordre de 1,50) et qui suggèrent que les animaux ne jeûnent pas. Lors de l'exposition au glyphosate, le niveau d'atrophie de la paroi des tubules digestifs ne varie pas significativement avec le temps et les concentrations. Après 35 jours d'exposition aux  $R_{EX}$  et POEAs, le niveau moyen de ce type d'anomalie tissulaire baisse chez les individus témoins et ne diffère pas significativement entre les concentrations des deux contaminants. Cependant, les niveaux d'atrophies restent plus élevés et similaires à celui qui est calculé à T0 pour les concentrations de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $R_{EX}$  et 0,1 et  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de POEAs. L'épaisseur de la paroi des tubules digestifs peut varier en fonction de facteurs intrinsèques comme le stade de digestion (Morton, 1977) et de facteurs extrinsèques comme le cycle de marée (Morton, 1977) ou la présence de contaminants (Auffret, 1988; Usheva *et al.*, 2006; Buisson



*et al.*, 2008; Amachree *et al.*, 2013). Les niveaux d'infiltrations hémocytaires observés après 35 jours d'exposition aux R<sub>EX</sub> et POEAs ne varient pas significativement dans le temps ou en fonction des concentrations. Au début de l'exposition au glyphosate, les infiltrations hémocytaires des huîtres mises en expérience sont relativement marquées et/ou fréquentes. De plus, après 56 jours d'expérience, ces infiltrations augmentent significativement chez les individus exposés aux trois concentrations (l'augmentation n'étant pas significative chez les individus témoins). Les infiltrations des tissus par les hémocytes sont souvent considérées comme le signe d'une inflammation tissulaire et elles ont été décrites chez des mollusques après exposition à différentes classes de polluants ou sur le terrain au niveau de sites pollués (Auffret, 1988; Syasina *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001; de los Ríos *et al.*, 2012). L'histopathologie peut être considérée comme un biomarqueur à réponse tardive. Peu de différences significatives sont observées entre les individus témoins et les huîtres exposées aux différentes concentrations mais nous pouvons émettre l'hypothèse que des temps d'exposition plus longs pourraient permettre de révéler davantage de différences entre les différentes conditions testées.

#### 6.4.6 Croissance

Lors de l'exposition au glyphosate, aucune croissance n'a été enregistrée que ce soit pour les individus témoins ou les individus exposés. La question de la qualité de l'alimentation choisie pour nourrir les juvéniles s'est donc posée. En effet, d'un point de vue quantitatif, la ration algale d'*Isochrysis galbana* (T-Iso) distribuée respecte les valeurs fournies par le «Guide pratique des écloséries de bivalves» utilisé pour la nutrition du jeune naissain et édité par la FAO (Helm *et al.*, 2006). De plus, cette souche algale est couramment utilisée en éclosérie pour l'alimentation des larves car elle est simple à cultiver et présente une croissance rapide (supérieure à celle d'autres espèces de microalgues). Cependant, il s'avère qu'*Isochrysis galbana* T-Iso possède une teneur élevée en acides gras poly-insaturés (AGPIs) tels que l'acide docosahecanoïque (ADH) qui n'est pas adapté pour l'alimentation des juvéniles d'huîtres. Elle ne constituerait donc pas une source alimentaire de qualité suffisante pour les juvéniles mis en expérience. Les juvéniles utilisés lors de la première expérimentation auraient donc été nourris suffisamment d'un point de vue quantitatif mais la qualité des apports nutritifs ne devait probablement pas être optimale. Par ailleurs, il aurait été préférable que l'alimentation des huîtres soit composée de plusieurs espèces algales mais, pour des raisons techniques, nous n'avons pu maintenir qu'une monoculture. Lors de l'exposition aux R<sub>EX</sub> et POEAs, la souche d'algue utilisée a été remplacée par *Tetraselmis suecica*

qui ne présente pas de carences en AGPIs. De plus, cet apport a été supplémenté par de la pâte d'algues à base de *Chaetoceros calcitrans* qui est une espèce de diatomée utilisée en éclosionerie. En plus d'une meilleure qualité des apports nutritifs, l'utilisation de la pâte d'algues a permis d'augmenter la ration apportée aux juvéniles puisque celle-ci a été en moyenne de  $8,68.10^8$  cellules par juvénile et par jour. Enfin, pour favoriser la croissance des huîtres, nous aurions pu jouer sur le facteur température en maintenant les animaux à une température supérieure à 17°C, température choisie pour les deux expérimentations. Nous n'avons pas opté pour cette solution car le risque de développement de microorganismes susceptibles d'entraîner des mortalités d'huîtres augmente avec la température.

La croissance des huîtres illustrée par la mesure des paramètres de taille, de poids et d'indices de condition montre globalement un effet des faibles doses de contaminants. Pour le glyphosate, si aucune différence en poids ou en taille n'est observée aux différentes dates de mesures, le calcul de l'indice de condition AFNOR révèle un effet négatif de la concentration la plus faible après 56 jours d'exposition. Pour cet indice, un effet des POEAs est par ailleurs mis en évidence et l'ensemble des individus exposés présente des taux de remplissage de la coquille par la chair qui ne sont significativement pas différents de ceux calculés à T0 alors que les individus témoins présentent des indices significativement plus élevés. Bien que les individus exposés au R<sub>EX</sub> ne soient pas différents des témoins au niveau de l'indice AFNOR, leur croissance en taille est significativement plus faible après 35 jours et le déficit de croissance est également observé chez les individus exposés aux POEAs.

La croissance est un biomarqueur permettant d'intégrer l'ensemble des perturbations subies par les individus. Si des retards de croissance sont observés, c'est que l'état physiologique des individus a pu être perturbé par l'exposition aux pesticides et que certains processus métaboliques peuvent avoir été affectés par ces contaminants. L'exposition des huîtres aux pesticides pourrait se traduire par une augmentation des mécanismes de défense qui accroîtraient les besoins énergétiques aux dépens, notamment, de la croissance (Sokolova *et al.*, 2012). Du fait de son caractère intégrateur, la croissance constitue un biomarqueur tardif et la poursuite des expérimentations sur des temps supérieurs à 35 jours (expositions aux R<sub>EX</sub> et POEAs) aurait probablement permis de mieux mettre en évidence les effets négatifs des molécules testées sur la croissance des huîtres.

## 6.5 Conclusion

L'exposition des huîtres pendant des temps d'exposition relativement longs a permis de mettre en évidence des effets sur des niveaux d'organisation différents. L'exposition au glyphosate suggère que des mécanismes de défense précoces se mettent en place au niveau moléculaire, même si les réponses observées ne se prolongent pas dans le temps (ex : augmentation de l'expression des GSTs à 24h). Au niveau tissulaire, seule une légère augmentation de l'ampleur des infiltrations hémocytaires est observée chez les individus exposés par rapport aux individus examinés à T0. L'exposition au glyphosate seul révèle la faible toxicité des doses testées avec la survie de tous les individus exposés ainsi qu'une croissance qui n'est pas différente entre les individus témoins et les individus exposés.

L'exposition aux R<sub>EX</sub> et POEAs n'a pas révélé d'effets drastiques au niveau du stress oxydant et les activités des enzymes étudiées n'ont pas présenté de variations importantes et significatives entre concentrations à une date donnée. En revanche, un effet des plus faibles doses a été mis en évidence pour la plupart des biomarqueurs étudiés. Les activités de la catalase et de la GSTs sont différentes à 7 jours pour la plus faible dose de POEAs (0,1 µg L<sup>-1</sup>). Un léger retard dans le déroulement de la gamétogenèse est observé pour les concentrations de 0,1 et 1 µg L<sup>-1</sup> de R<sub>EX</sub> et de POEAs. Enfin, les différents paramètres de croissance montrent des différences significatives au cours du temps entre les huîtres témoins et les huîtres exposées au R<sub>EX</sub> ou aux POEAs.

La toxicité de l'ensemble des molécules testées apparaît comme relativement faible mais les effets de la formulation commerciale et des adjuvants sur les juvéniles d'huîtres se révèlent plus importants que ceux observés avec le glyphosate seul. Enfin, un effet des plus faibles doses (0,1 et µg L<sup>-1</sup>) est mis en évidence mais des investigations complémentaires sont nécessaires afin d'en appréhender pleinement l'ampleur ainsi que les mécanismes et modes d'action.



## **Cinquième partie**

# **Conclusion générale-perspectives**



## Chapitre 7

# Conclusion générale-perspectives

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail de thèse est résumé dans la figure 7.1. Toutes les molécules étudiées sont en rapport avec des produits phytopharmaceutiques à usage herbicide. Ainsi, les travaux réalisés ne se sont pas limités à l'étude des matières actives seules mais également à des formulations commerciales (matière active + adjuvants), aux adjuvants seuls et aux produits de dégradation des herbicides. Différents niveaux d'organisation du vivant ont été pris en compte et des approches *in vitro* et *in vivo* ont été entreprises afin d'évaluer la réponse des organismes à des contaminants potentiellement retrouvés dans le milieu marin. Pour l'approche *in vitro*, les hémocytes d'ormeaux sont utilisés car, contrairement aux hémocytes d'huîtres, ils présentent l'avantage de pouvoir être maintenus en culture pendant plusieurs jours (Latire *et al.*, 2012). En ce qui concerne l'approche *in vivo*, les expérimentations sur les larves de *C. gigas* concernent les stades de développement les plus précoces (de la fécondation à la larve véligère D) et, avec l'étude de la métamorphose, elles s'intéressent également à une étape critique marquant la fin de la vie larvaire et pélagique de *C. gigas*. Enfin, l'utilisation de juvéniles de *C. gigas* permet d'étudier l'effet d'expositions relativement longues (subchroniques) sur différents paramètres individuels et infra-individuels.

Approche in vivo: larves de C. gigas (36h et 24h)				Approche in vivo: juvéniles de C. gigas (56j et 35j)			
		% Larves D normales	Métamorphose				
GLY	↘ (EC <sub>50</sub> : 28,31 mg L <sup>-1</sup> )	↘ (EC <sub>50</sub> : >100 mg L <sup>-1</sup> )		GLY		REX	POEAs
AMPA	↘ (EC <sub>50</sub> : 40,61 mg L <sup>-1</sup> )	pas d'effet		Taille		pas d'effet	↘ (0,1-100 µg L <sup>-1</sup> ; 35 jours)
REX	↘ (EC <sub>50</sub> : 1,13 mg L <sup>-1</sup> )	↘ (EC <sub>50</sub> : 6,37 mg L <sup>-1</sup> )		Poids		pas d'effet	↘ (0,1 µg L <sup>-1</sup> ; 7 jours)
R <sub>AT</sub>	↘ (EC <sub>50</sub> : 1,67 mg L <sup>-1</sup> )	↘ (EC <sub>50</sub> : 6,06 mg L <sup>-1</sup> )		Indice AFNOR		↘ (0,1 µg L <sup>-1</sup> ; 56 jours)	pas d'effet
POEAs	↘ (EC <sub>50</sub> : 0,26 mg L <sup>-1</sup> )	↘ (EC <sub>50</sub> : 3,03 mg L <sup>-1</sup> )		Gamétiogenèse		pas d'effet	↘ (0,1-1 µg L <sup>-1</sup> ; 35 jours=T0)
MCPP	↘ (EC <sub>50</sub> : 42,55 mg L <sup>-1</sup> )	pas d'effet		Atrophie tubule GD		pas d'effet	↘ (1 µg L <sup>-1</sup> ; 35 jours=T0)
MCPP-P	↘ (EC <sub>50</sub> : 78,85 mg L <sup>-1</sup> )	pas d'effet		Déstructuration		pas d'effet	pas d'effet
2-MCP	↘ (EC <sub>50</sub> : 10,81 mg L <sup>-1</sup> )	↘ (EC <sub>50</sub> : 7,20 mg L <sup>-1</sup> )		Infiltration		↗ (exposés/T0)	pas d'effet

Approche in vitro: hémocytes de H. tuberculata (72h)				Approche in vivo: juvéniles de C. gigas (56j et 35j)			
		GLY	REX	POEAs			
MTT	pas d'effet	↘ (EC<sub>50</sub>: 41,42 mg L<sup>-1</sup>)	↘ (EC<sub>50</sub>: 1,85 mg L<sup>-1</sup>)	CATs	pas d'effet	↘ (0,1 µg L<sup>-1</sup>; 7 jours)	
RRN	↗ (0,1 µg L<sup>-1</sup>)	↘ (à partir de 10 mg L<sup>-1</sup>)	↘ (à partir de 1,92 mg L<sup>-1</sup>)	GSTs	pas d'effet	↗ (0,1 µg L<sup>-1</sup>; 7 jours)	
phagocytose	↘ (100 mg L<sup>-1</sup>)	↘ (à partir de 10 mg L<sup>-1</sup>)	↘ (à partir de 1,02 mg L<sup>-1</sup>)	MDA	↘ (100 µg L<sup>-1</sup>; 7 jours)	↘ (0,1 µg L<sup>-1</sup>; 7 jours)	

GLY			
MT1 & 2	↗ (100 µg L <sup>-1</sup> ; 24h, 7 jours, 14 jours)		
GSTs	↗ (100 µg L <sup>-1</sup> ; 24h)		
MXR	↗ (0,1-1-100 µg L <sup>-1</sup> ; 28 jours)		
HSC72	↘ (100 µg L <sup>-1</sup> ; 28 jours)		



## 7.1 Biomarqueurs et stades de vie étudiés

Les différents modèles et stades de vie étudiés ont montré des sensibilités différentes vis-à-vis de la contamination par les mêmes molécules. Les hémocytes d'ormeaux, par exemple, ont présenté une sensibilité assez faible après exposition au  $R_{EX}$  et la  $CE_{50}$  calculée pour la « viabilité » des hémocytes est aussi élevée que  $41,42 \text{ mg L}^{-1}$  (Figure 7.1). Les tests *in vitro* constituent de bons outils pour évaluer les mécanismes de toxicité au niveau cellulaire mais ils n'intègrent pas l'ensemble des régulations et processus physiologiques (tels que les axes de contrôles neuroendocriniens) qui existent au sein d'un organisme entier et peuvent être affectés par un polluant. De plus, certains contaminants possèdent une toxicité spécifique pour certains organes et l'utilisation des cellules du tissu sanguin de l'ormeau ne permettrait pas alors d'appréhender pleinement les effets du  $R_{EX}$  chez cet organisme. Un autre point important à souligner est la différence de sensibilité enregistrée pour les deux stades larvaires de *C. gigas* étudiés. Il est généralement considéré que les stades les plus précoces sont plus sensibles et cette tendance a été vérifiée pour la majeure partie des contaminants lorsque l'on compare les valeurs de  $CE_{50}$  calculées pour les tests sur le développement embryo-larvaire et la métamorphose (Figure 7.1). En effet dans le cas des molécules apparentées au glyphosate, les premiers stades de vie larvaire se sont révélés plus sensibles que les larves pédivéligères plus âgées. L'embryogenèse est caractérisée par des taux de divisions cellulaires élevés qui vont permettre la mise en place des différents organes. L'exposition à des contaminants pourrait perturber tout particulièrement les phénomènes de divisions cellulaires et d'organogénèse expliquant alors la sensibilité de ces stades. De plus, la mise en place des mécanismes de défense pourrait ne pas être totale ou ces mécanismes pourraient ne pas être aussi efficaces chez les stades les plus jeunes comparés à des individus plus âgés. L'exposition au 2-MCP a cependant montré un résultat différent puisque la valeur de  $CE_{50}$  calculée pour la métamorphose s'est révélée plus faible que celle enregistrée pour le test d'embryotoxicité (Tableau 7.1). Les mécanismes impliqués dans la métamorphose ont été étudiés par Coon et Bonar (1985 et 1987) qui ont souligné chez *C. gigas* l'importance des récepteurs homologues aux alpha-adrénergiques des vertébrés et des neurotransmetteurs comme l'adrénaline et la noradrénaline. Le 2-MCP pourrait interagir spécifiquement avec ces récepteurs et neurotransmetteurs expliquant ainsi la plus forte toxicité de cette molécule pour les processus de métamorphose.

## Éléments à retenir et perspectives

L'évaluation de la toxicité des contaminants nécessite une approche multi-marqueur car les différents biomarqueurs situés à différents niveaux d'organisation du vivant sont complémentaires. Nos travaux ont mis en évidence la sensibilité des stades de vie précoces de *C. gigas* par l'étude de biomarqueurs individuels. Au cours de la thèse, des essais ont été réalisés chez les larves D pour apprécier leur état physiologique (effets sub-létaux). Ainsi, l'effet des herbicides sur les tissus a été considéré en histologie (méthode de double enrobage) mais les résultats peu probants d'un point de vue technique ne nous ont pas incités à poursuivre ces investigations. Par ailleurs, nous avons considéré les réserves en lipides neutres chez des larves véligères D et pédivéligères après exposition aux herbicides en faisant appel à un marquage au Rouge du Nil avec observation en fluorescence et analyse d'images. Une alternative pour les larves D consistait à évaluer la fluorescence en cytométrie en flux. Les premiers résultats ont montré la faisabilité de ces approches, en particulier sur les larves véligères D et il serait intéressant à l'avenir de poursuivre ces travaux de façon à compléter l'étude de l'embryotoxicité par un biomarqueur biochimique.

Chez *H. tuberculata*, les tests *in vitro* ont montré un effet du  $R_{EX}$  sur les deux paramètres cellulaires étudiés (rétention du rouge neutre et phagocytose) alors qu'aucun effet n'avait été observé sur la « viabilité » des cellules (test MTT). Ces résultats sub-létaux suggèrent un effet au niveau des membranes biologiques. Des résultats relatifs aux DROs sont disponibles (Cf. annexes A) mais présentent des variations interindividuels trop importantes pour conclure. Il serait intéressant de réitérer les expérimentations afin d'appréhender les effets des différentes molécules au niveau du stress oxydant. Par ailleurs, les essais de culture cellulaire d'hémocytes de *C. gigas* pendant la thèse n'ont pas été fructueux. Un stress oxydant ne permettant pas la survie des cellules pouvant être suspecté, une piste intéressante pour de futures recherches serait l'utilisation dans les cultures de molécules anti-oxydantes (Bouki *et al.*, 2013).

L'impact des herbicides sur les juvéniles a été évalué du niveau moléculaire au niveau individuel. La croissance, biomarqueur qui intègre l'ensemble des réponses physiologiques, est facile à mettre en œuvre et a donné des résultats intéressants (effets des faibles doses) mais qui auraient pu l'être davantage si les expositions avaient pu être poursuivies. Pour les expositions subchroniques, des résultats complémentaires restent à acquérir : l'expression des gènes ciblés chez des individus exposés au  $R_{EX}$  et POEAs, les activités enzymatiques des huîtres exposées au glyphosate et la dyna-

mique du système lysosomal appréciée par des techniques histochimiques. Du point de vue histopathologique, il serait particulièrement utile à l'avenir de se focaliser sur les infiltrations hémocytaires (diffuses ou locales) des tissus et, notamment, du tissu conjonctif afin d'en déterminer les modalités et l'éventuel lien avec l'exposition à des contaminants. La détermination des stades de gamétogenèse constitue une première approche (qualitative) de la reproduction des organismes. Les lames histologiques des individus étudiés seront réexaminées de façon à quantifier le développement gonadique par une méthode d'analyse d'images. Afin de confirmer les résultats enregistrés pour l'expression des gènes, il serait tout particulièrement intéressant d'étudier l'induction des MXRs et des métallothionéines au niveau protéique par des différentes techniques telles que des tests ELISA ou des western blot. Peu de différences entre les différentes conditions ayant été enregistrées au niveau des activités enzymatiques des catalases et GSTs, l'étude des activités d'enzymes différentes impliquées dans les processus de régulation du stress oxydant (SOD) et de la détoxification des xénobiotiques (activité EROD : CYP450) pourraient être une piste de recherche pertinente.

## 7.2 Herbicides chlorophénoxylés et molécule apparentée (2-MCP)

L'étude des effets du mecoprop, mecoprop-p et 2-MCP sur deux stades larvaires montre des résultats intéressants sur la toxicité relative des molécules. Le mecoprop est un herbicide à usage général dont le mode d'action est de mimer celui de l'auxine, une phyto-hormone, afin de provoquer la pousse anarchique puis la mort des végétaux. Le mecoprop est un mélange racémique de deux stéréo-isomères et l'isomère dextrogyre, aussi appelé mecoprop-P est le seul à présenter une action herbicide. La molécule résultant de la dégradation du mecoprop et du mecoprop-p est le 2-MCP, seul produit de dégradation connu de ces herbicides. Si les pourcentages maximums d'occurrence (% de molécule mère transformée en métabolite) sont faibles pour les MCPP et MCPP-P (0,035%), il est important de noter que le 2-MCP peut être le produit de dégradation d'autres molécules telles que le MCPA-thioethyl (0,198%) et le MCPA (0,09%) lui-même métabolite du MCPA-thioethyl (0,66%) et du MCPB (0,062%) (PPDB, 2013). Même si à notre connaissance, il n'existe pas de données relatives aux concentrations environnementales de 2-MCP, ce produit pourrait être retrouvé dans l'environnement étant donné le nombre important de molécules mères dont il peut être le produit.

Les tests embryo-larvaires réalisés pour les deux herbicides chlorophénoxylés soulèvent des points importants. Le premier constat est que le 2-MCP apparaît toujours

plus toxique que les molécules dont il est issu. En effet, les concentrations induisant 50% de développement anormal sont égales à 10,81 mg L<sup>-1</sup> pour le 2MCP tandis qu'elles sont de 42,55 mg L<sup>-1</sup> pour le MCPP et de 78,85 mg L<sup>-1</sup> pour le MCPP-P (Figure 7.1). De plus, dans la gamme de concentrations testées, il n'a pas été possible d'évaluer la toxicité des MCPP et MCPP-P au niveau des processus de métamorphose alors que la concentration inhibant la métamorphose chez 50% des larves pédivéligères exposées au 2-MCP est égale à 7,20 mg L<sup>-1</sup>. Le deuxième fait marquant concerne la différence de toxicité entre les deux formes de mecoprop. En effet, selon les tests d'embryotoxicité, il apparaît que le MCPP est environ deux fois plus toxique que le MCPP-P. Cet effet semble être dû uniquement à l'énantiomère (S) qui ne possède pas d'activité herbicide puisque le MCPP se compose d'un mélange des deux énantiomères tandis que le MCPP-P est composé à 99% de l'énantiomère (R). Le dernier point important apporté par l'étude des herbicides chlorophénoxylés concerne le mode d'action de ces molécules. En effet, les tests d'embryotoxicité révèlent que l'exposition au MCPP augmente de façon significative la fréquence des larves présentant des anomalies de coquille. Ce type d'effet semble spécifique de l'énantiomère (S) car la forte occurrence des dommages à la coquille n'a été observée pour aucune autre molécule testée.

### **Éléments à retenir et perspectives**

De cette étude relative aux effets d'herbicides sur les larves de *C. gigas*, nous tirons l'enseignement que pour évaluer la toxicité d'une molécule, il ne faut pas considérer seulement les molécules mères mais également sur le cortège de molécules qui résulte de leur dégradation et qui peuvent posséder des propriétés toxiques plus fortes. De plus, des différences structurales entre molécules (énantiomères) peuvent conduire à des toxicités et des modes d'action différents alors que peu de différences étaient *a priori* attendues. L'étude des composés de la « famille » du mecoprop s'est limitée à l'exposition de deux stades larvaires de *C. gigas* pendant des temps d'exposition courts ; il serait intéressant de poursuivre ces études dans le cadre d'expositions longues et d'expositions *in vitro* afin de mettre en évidence leurs modes d'action de manière plus fine. La littérature concernant les effets de contaminants sur les processus de biominéralisation chez des mollusques est, à notre connaissance, très peu fournie. Une perspective du présent travail serait d'étudier très finement l'impact du MCCP (qui s'est révélé une molécule d'intérêt dans ce domaine de recherche) sur la microstructure et la composition chimique de coquilles de larves ou de jeunes huîtres. Ce travail pourrait être fait en collaboration avec des membres de la future équipe 1 de l'UMR BOREA « Evolution

des Biominéralisations et Adaptation aux Contraintes Environnementales ».

### 7.3 Glyphosate et composés apparentés (AMPA, formulations commerciales et adjuvants)

Si le 2-MCP s'est avéré plus toxique que sa molécule mère, l'AMPA qui est le produit de dégradation du glyphosate s'est révélé peu toxique pour les larves d'huîtres. En effet, la concentration induisant 50% de larves anormales est de 40 mg L<sup>-1</sup> (Figure 7.1), ce qui correspond à une dose élevée. De plus, un effet limité (mais significatif) sur la métamorphose n'est observé que pour la plus forte dose (100 mg L<sup>-1</sup>). L'AMPA ne semble donc pas poser de réels problèmes pour les stades embryo-larvaires de *C. gigas* à court terme. Ce constat est étayé par les tests d'écotoxicité réalisés chez les organismes modèles classiquement étudiés qui indiquent des CE<sub>50</sub> aussi fortes que 520 mg L<sup>-1</sup> chez *O. mykiss* et 690 mg L<sup>-1</sup> chez *D. magna*. Les principales préoccupations concernant l'AMPA proviennent du fait qu'il soit relativement persistant dans les sols et dans le milieu aquatique (Battaglin *et al.*, 2005; Kolpin *et al.*, 2006). Dans le travail de thèse, les données relatives à l'AMPA ne concernent que le niveau individuel sur de courtes périodes d'exposition. Le faible nombre de biomarqueurs étudiés ne permet pas de conclure définitivement sur l'innocuité de cette molécule et des mécanismes d'action plus fins pourraient être révélés, au niveau moléculaire par exemple. Ainsi, Manas et ses collaborateurs (2009) rapportent un effet génotoxique (test des COMET) de l'AMPA sur des cellules de lignées cellulaires humaines (Hep-2).

La molécule mère de l'AMPA, le glyphosate, est à ce jour l'une des molécules herbicides les plus utilisées dans le monde. Les travaux réalisés au cours de cette thèse permettent de comparer les effets de cette molécule sur un ensemble de biomarqueurs moléculaires, cellulaires, tissulaires et individuels. L'analyse de l'ensemble des résultats suggère que le glyphosate est peu toxique pour les deux espèces de mollusques étudiés mais que des mécanismes de défense efficaces sont mis en place pour supprimer ou limiter les effets néfastes de ce contaminant. Par exemple au niveau cellulaire, la survie des hémocytes d'ormeaux n'est pas affectée quelle que soit la concentration de glyphosate considérée même si une légère baisse de la phagocytose est enregistrée à la concentration de 100 mg L<sup>-1</sup> (Figure 7.1). L'augmentation de la rétention du rouge neutre pour les hémocytes exposés à la concentration de 0,1 µg L<sup>-1</sup> peut être considérée comme une stimulation du système lysosomal, signe d'un stress général (Bado-Nilles

*et al.*, 2008; Braunbeck et Appelbaum, 1999). Néanmoins, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour discriminer un réel effet sur la stabilité des membranes lysosomales d'une éventuelle prolifération de ces organites. Les expositions des hémocytes d'*H. tuberculata in vitro* ne révèlent pas d'effets délétères après 72h d'exposition mais l'activation du système lysosomal suggère la mise en place de mécanismes pour détoxiquer le glyphosate. L'activation de systèmes de défense a été enregistrée lors de l'exposition *in vivo* de juvéniles d'huîtres pendant 28 jours au glyphosate, notamment au niveau de la transcription de certains gènes impliqués dans les processus de détoxification. En effet, l'augmentation de la transcription est enregistrée pour les GSTs (24h), métallothionéines 1 & 2 (24h, 7 jours et 14 jours) et MXR (28 jours). Bien que des différences statistiques soient notées, l'augmentation du niveau de transcrits reste faible et il importe de souligner qu'on ne peut pas l'assimiler à une « véritable induction ». Des expérimentations supplémentaires restent nécessaires pour confirmer ces résultats. Aux niveaux tissulaire et individuel, peu d'effets néfastes sont notés et nous en déduisons que l'activation de certains mécanismes de défense observés seraient suffisamment efficaces pour maintenir l'homéostasie. Les effets significatifs constatés correspondent à un indice AFNOR significativement plus faible à la concentration de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (après 56 jours) et à une plus grande ampleur des infiltrations hémocytaires chez les individus exposés. En dehors d'une blessure ou encore d'une infection par des pathogènes, il est difficile d'interpréter certaines altérations histopathologiques telles que les infiltrations du tissu conjonctif par les hémocytes (Au, 2004; Kim *et al.*, 2008). Néanmoins, les hémocytes sont des cellules présentant de multiples fonctions et ils peuvent participer à la détoxification des polluants et en particulier des métaux au niveau de l'hémolymph (Gagnaire, 2005).

La toxicité limitée du glyphosate vis-à-vis des juvéniles est également confirmée vis-à-vis des deux stades larvaires lors des expositions aiguës. En effet, aucun effet n'est observé sur les processus de métamorphose malgré les doses importantes testées (jusqu'à  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). De même, au niveau des stades larvaires les plus précoces exposés de la fécondation jusqu'au stade de larve D (36h), la concentration induisant 50% de développement anormal est de  $28,31 \text{ mg L}^{-1}$  (Figure 7.1). Cette concentration peut paraître élevée mais elle révèle tout de même la relative sensibilité des stades larvaires par rapport aux tests écotoxicologiques classiquement utilisés (ex :  $\text{CE}_{50}$  48h *Daphnia magna* =  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , NOEC 21 jours *Daphnia magna* =  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) (PPDB, 2013).

Le glyphosate n'est jamais utilisé seul ; il est formulé avec un ou plusieurs adjuvants

afin d'en améliorer les propriétés herbicides. Dans les formulations commerciales à base de glyphosate, les adjuvants sont utilisés pour permettre la pénétration de la matière active à travers la cuticule des végétaux de façon à ce qu'elle atteigne sa cible qui est l'enzyme 5-enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphate synthase impliquée dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques spécifique des végétaux. Ces adjuvants sont considérés comme étant chimiquement inertes et n'interagissant pas avec les organismes non cibles. Cependant, l'examen de la littérature révèle que les formulations commerciales et les adjuvants seuls sont plus toxiques que les matières actives pour un ensemble d'organismes non cibles (Tsui et Chu, 2003; Howe *et al.*, 2004; Brausch et Smith, 2007; Brausch *et al.*, 2007; Mesnage *et al.*, 2012). Les informations fournies par les fabricants de formulations commerciales de glyphosate concernent uniquement les concentrations en matière active et la composition précise est toujours tenue secrète. De plus, on peut penser que les concentrations sont peu précises ou bien données à titre indicatif car lorsque nous avons fait analyser les deux formulations utilisées pour exposer les stades embryo-larvaires ( $R_{EX}$  et  $R_{AT}$ ), les concentrations se sont révélées supérieures de 32,22% et 42,50%, respectivement, par rapport aux valeurs qui étaient indiquées sur les emballages. Les adjuvants les plus communément utilisés dans les formulations commerciales de glyphosate sont les amines de suif polyéthoxylées (POEAs). Les données de la littérature montrent que le POE-15 est le plus fréquemment ajouté dans les formulations, avec des concentrations généralement comprises entre 10 et 20% selon les produits considérés (Howe *et al.*, 2004; Mesnage *et al.*, 2012). Les données de concentrations exactes en adjuvants pour les différentes formulations commerciales testées lors de travail ne sont malheureusement pas disponibles. Les concentrations indiquées pour ces produits sont donc toujours indiquées en équivalent glyphosate.

Alors que l'exposition au glyphosate n'a pas provoqué d'effets délétères, une baisse de la viabilité des hémocytes d'ormeau après 72h d'exposition *in vitro* est enregistrée pour le  $R_{EX}$  et les adjuvants avec des  $CE_{50}$  de 41,42 et 1,85 mg L<sup>-1</sup> respectivement (Figure 7.1). Cette baisse de viabilité s'accompagne d'une baisse de la stabilité membranaire lysosomale à partir de 10 mg L<sup>-1</sup> de  $R_{EX}$  et de 1,92 mg L<sup>-1</sup> de POEAs. De même la phagocytose des hémocytes est significativement inhibée à partir de 10 mg L<sup>-1</sup> de  $R_{EX}$  et de 1,02 mg L<sup>-1</sup> de POEAs. Ces résultats soulignent l'effet toxique des formulations commerciales et des adjuvants sur les cellules du système immunitaire chez *H. tuberculata* et cet effet semble lié à la modification des membranes des organites et des cellules.

L'analyse des niveaux d'expression transcriptionnelle des gènes n'a pas encore pu être réalisée chez les huîtres exposées aux R<sub>EX</sub> et POEAs. Cependant, afin de mieux appréhender l'effet des doses environnementales au niveau infra-cellulaire, les activités de deux enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant (catalases) et la détoxification des xénobiotiques (GSTs) ont été étudiées. De plus, les niveaux de peroxydation lipidique (concentrations en MDA) ont été pris en considération afin d'évaluer un potentiel effet des composés testés, notamment sur les membranes cellulaires. Les activités enzymatiques des catalases et GSTs ne montrent pas de différences significatives pour les différentes concentrations de REX et POEAs testées pour un temps donné. Un effet de la plus faible dose d'adjuvants est cependant enregistré avec une baisse significative de l'activité des catalases et une augmentation significative de l'activité des GSTs après 7 jours d'exposition (Figure 7.1). Il est à noter que cette dernière est concomitante à un niveau bas en MDA. Peu de différences sont observées pour l'activité des enzymes enregistrées et ce résultat suggère que des systèmes enzymatiques (autres que ceux appréhendés ici) et non enzymatiques de lutte contre les DROs agirait de façon efficace. Nous émettons cette hypothèse car il a déjà été rapporté dans la littérature que les pesticides, y compris le glyphosate, engendrent chez les organismes exposés du stress oxydant (Contardo-Jara *et al.*, 2009). Les biomarqueurs subcellulaires utilisés lors des expositions longues ne permettent pas d'expliquer les effets observés aux niveaux tissulaires et individuels chez les juvéniles. En effet, après 35 jours, un léger retard dans le déroulement de la gamétogenèse est noté pour les doses de 0,1 et 1 µg par L<sup>-1</sup> de R<sub>EX</sub> et POEAs (et les individus exposés à ces concentrations ne diffèrent pas statistiquement des individus à T0) (Figure 7.1). De plus, la taille des huîtres est significativement plus faible pour les huîtres exposées à 0,1 et 100 µg L<sup>-1</sup> de R<sub>EX</sub> et à l'ensemble des concentrations en POEAs. La croissance pondérale est uniquement affectée à 14 jours d'exposition à la plus faible concentration de R<sub>EX</sub> et les indices de condition sont significativement plus faibles pour l'ensemble des individus exposés au POEAs à 35 jours. Le point important qu'ils convient de retenir concerne les effets des plus faibles doses (0,1 et 1 µg par L<sup>-1</sup>) qui semblent plus délétères au niveau des paramètres de croissance et de maturation étudiés par rapport à la dose de 100 µg L<sup>-1</sup>. L'effet des faibles doses de contaminant n'a pas été observé de façon marquante au niveau des deux stades larvaires étudiés. Deux formulations commerciales, le Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) et le Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>) et un mélange commercial d'adjuvants à base de POEAs (Genamin T-200®) ont été étudiées. Les R<sub>EX</sub> et R<sub>AT</sub> expriment une toxicité plus importante que la molécule de glyphosate et les doses (en



équivalent glyphosate) induisant 50% d'anomalies du développement sont, respectivement, égales à 1,13 et 1,67 mg L<sup>-1</sup> (Figure 7.1). De plus, la CE50 du Genamin T-200® pour les mêmes stades larvaires s'avère aussi faible que 0,26 mg L<sup>-1</sup>. Pour la métamorphose, même si les statistiques utilisées n'ont pas permis d'observer d'effets des faibles doses sur les huîtres exposées aux R<sub>EX</sub>, R<sub>AT</sub> et Genamin T-200®, il est intéressant de noter la légère baisse des taux pour les concentrations de 1 µg L<sup>-1</sup> des deux formulations commerciales testées.

### Éléments à retenir et perspectives

Les différents résultats obtenus et leur comparaison nous permettent de tirer plusieurs conclusions sur les effets et la toxicité du glyphosate, des formulations commerciales et des adjuvants sur les organismes non-cibles que constituent les hémocytes d'ormeaux et les différents stades de vie de *C. gigas*. Pour l'ensemble des biomarqueurs étudiés, le glyphosate en combinaison avec des adjuvants ou les adjuvants testés seuls sont toujours plus toxiques que la matière active. Les concentrations en adjuvants ne sont pas connues dans les différentes formulations commerciales et pour de futures études écotoxicologiques il serait particulièrement intéressant d'en rechercher la composition précise à l'aide d'outils analytiques tels que la spectrométrie de masse (Mesnage et al., 2012). De telles analyses pourraient, par exemple, expliquer les légères différences de toxicité observées entre les deux formulations commerciales sur les stades embryo-larvaires. Les données de la littérature indiquent un faible potentiel toxique du glyphosate (Tsui et chu 2003, Contardo-Jara et al., 2009 ; Hedberg and Wallin 2010) et les biomarqueurs étudiés sur *C. gigas* confirment ce fait. Dans un contexte de gestion durable de l'environnement et de législation européenne (notamment de la DCE et de la DCSMM), il nous apparaît tout particulièrement intéressant à l'avenir de focaliser les études écotoxicologiques sur les différentes formulations qui sont utilisées par les particuliers et en agriculture. Cette remarque vaut pour le glyphosate et peut être pour d'autres pesticides dont il conviendrait d'étudier non seulement la matière active mais également les formulations commerciales qui font l'objet d'une législation moins stricte.

Les travaux menés dans la thèse sur le glyphosate et les composés apparentés soulignent un fait *a priori* non attendu et pourtant très intéressant : la toxicité supérieure des plus faibles concentrations (0,1 et 1 µg L<sup>-1</sup>) par rapport à une concentration 100 à 1000 fois supérieure. Ces résultats restent à confirmer notamment par la mise en

place d'expérimentations répliqués dans les mêmes conditions expérimentales. Si l'effet des faibles doses de pesticides sur la croissance et le déroulement de la gamétogenèse venait à se confirmer, les doses de pesticides retrouvées dans l'environnement marin pourraient potentiellement représenter une menace pour les populations naturelles d'huîtres ou les cheptels en élevage.

#### 7.4 Synthèse sur la toxicité des différents composés testés sur *C. gigas* et *H. tuberculata*

Dans l'ensemble de la thèse, il a été possible de calculer des valeurs de CE<sub>50</sub> pour l'embryotoxicité et le test de la métamorphose chez les huîtres et le test MTT chez les ormeaux. Ces valeurs d'CE<sub>50</sub> nous permettent de classer les différents composés testés en fonction de leur toxicité selon des classifications telles que la typologie de l'Agence de Protection de l'Environnement américaine ici choisie (Tableau 7.1)

TABLE 7.1 – Classification de la toxicité pour les espèces aquatiques adoptée par l'Agence de Protection de l'Environnement américaine (U.S. EPA).

CE <sub>50</sub> toxicité aigüe (mg L <sup>-1</sup> )	Classification de la toxicité selon L'U.S. EPA
> 100	Pratiquement non toxique
> 10 ; ≤ 100	Légèrement toxique
> 1 ; ≤ 10	Modérément toxique
≥ 0,1 ; ≤ 1	Hautement toxique
< 0,1	Très hautement toxique

En fonction des biomarqueurs, les molécules testées se répartissent entre les catégories de « pratiquement non toxique » (5 cas sur 19) et « hautement toxique » pour les POEAs vis-à-vis du développement embryon-larvaire (Tableau 7.2).

TABLE 7.2 – Catégories pour la toxicité des différents composés testés selon la classification de l'U.S. EPA

	Embryotoxicité	Métamorphose	Viabilité des hémocytes (MTT)
glyphosate	Légèrement toxique	Pratiquement non toxique	Pratiquement non toxique
Roundup Express®	Modérément toxique	Modérément toxique	Légèrement toxique
POEAs - Genamin T-200®	Hautement toxique	Modérément toxique	Modérément toxique
AMPA	Légèrement toxique	Pratiquement non toxique	
Roundup Allées et Terrasses®	Modérément toxique	Modérément toxique	
MCPP	Légèrement toxique	Pratiquement non toxique	
MCPP-P	Légèrement toxique	Pratiquement non toxique	
2MCP	Légèrement toxique	Modérément toxique	

L'ensemble des résultats obtenus permet d'affirmer que les composés testés ne peuvent pas engendrer de mortalités ostréicoles aux doses mesurées dans l'environnement et pour les différents stades de vie étudiés. Néanmoins, les résultats acquis suggèrent que les concentrations environnementales d'herbicides et notamment celles des formulations commerciales et des adjuvants peuvent modifier certains paramètres physiologiques des individus exposés pendant des périodes de temps prolongées (expositions subchroniques). De plus, au niveau des milieux côtiers, les huîtres sont exposées à un mélange de contaminants (dont les herbicides) et les interactions entre molécules pourraient se révéler plus néfastes que les substances considérées seules. Ainsi, comme cela a déjà été suggéré dans les conclusions du programme MOREST, les molécules herbicides pourraient constituer un facteur de stress pendant la période précédant les épisodes de mortalité estivale.



## **Références bibliographiques**



# Bibliographie

- AARAB, N., MINIER, C., LEMAIRE, S., UNRUH, E., HANSEN, P.-D., LARSEN, B. K., ANDERSEN, O.-K. et NARBONNE, J.-F. (2004). Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Marine Environmental Research*, 58(2-5):437–41.
- AFNOR (2009). Bio indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux. XP-T90-382. Rapport technique.
- AKCHA, F., IZUEL, C., VENIER, P., BUDZINSKI, H. et BURGEOT, T. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49:269–287.
- AKCHA, F., SPAGNOL, C. et ROUXEL, J. (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106-107:104–113.
- ALVAREZ, M. et FRIEDL, F. (1992). Effects of a fungicide on in vitro hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 107(2-3):135–140.
- ALVES, S. R. C., SEVERINO, P. C., IBBOTSON, D. P., da SILVA, A. Z., LOPES, F. R. a. S., SÁENZ, L. a. et BAINY, A. C. D. (2002a). Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*, 54(3-5):241–5.
- ALVES, S. R. C., SEVERINO, P. C., IBBOTSON, D. P., da SILVA, A. Z., LOPES, F. R. a. S., SÁENZ, L. a. et BAINY, A. C. D. (2002b). Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*, 54(3-5):241–245.
- AMACHREE, D., MOODY, a. J. et HANDY, R. D. (2013). Comparison of intermittent and continuous exposures to cadmium in the blue mussel, *Mytilus edulis* : Accumulation and sub-lethal physiological effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95:19–26.

- AMARA, A. (2012). *Evaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : microalgues , échinoderme , bivalves et poisson*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale.
- AMRHEIN, N., DEUS, B., GEHRKE, P. et STEINRÜCKEN, H. C. (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology*, 66(5):830–834.
- ANDERSON, R. S., PATEL, K. M. et ROESIADI, G. (1999). Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger : implications for hemocyte defense responses. *Developmental and comparative immunology*, 23(6):443–9.
- ANGUIANO, G., LLERA-HERRERA, R., ROJAS, E. et VAZQUEZ-BOUCARD, C. (2007). Subchronic organismal toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, and feeding response of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to lindane (gamma-HCH) exposure under experimental conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(10):2192–7.
- ARLENY, I., TABOURET, H., RODRIGUEZ-GONZALEZ, P., BAREILLE, G., DONARD, O. F. X. et AMOUROUX, D. (2007). Methylmercury bioconcentration in muscle tissue of the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary (Bay of Biscay, France). *Marine Pollution Bulletin*, 54(7):1031–6.
- ARNOLD, G., LUCKENBACH, M. et UNGER, M. (2004). Runoff from tomato cultivation in the estuarine environment : biological effects of farm management practices. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298(2):323–346.
- ASTM (1991). (American Society for Testing and Materials). Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of salt-water bivalve molluscs. In *Annual Book of ASTM Standards. Water and Environmental Technology. Volume 11.04*, pages 256– 272. Amer. Soc. Test. Materials., Philadelphia, PA.
- AU, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring : a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9-10):817–34.
- AUBY, I., BOCQUENE, G., QUINIOU, F. et DRENO, J.-P. (2007). Etat de la contamination du bassin d’Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. Impact environnemental. Rapport technique.
- AUFFRET, M. (1988). Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 46(April 1986):101–107.



- AUFFRET, M. et OUBELLA, R. (1997). Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas* : *In Vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118(3):705–712.
- AUFFRET, M., ROUSSEAU, S., BOUTET, I., TANGUY, A., BARON, J., MORAGA, D. et DUCHEMIN, M. (2006). A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3):393–405.
- BACHELOT, M. (2010). *Contamination de moules (Mytilus sp.) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier 1.
- BACHELOT, M., LI, Z., MUNARON, D., LE GALL, P., CASELLAS, C., FENET, H. et GOMEZ, E. (2012). Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. *The Science of the total environment*, 420:273–9.
- BADO-NILLES, A., GAGNAIRE, B., THOMAS-GUYON, H., LE FLOCH, S. et RENAULT, T. (2008). Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro*, 22(6):1610–7.
- BAIER-ANDERSON, C. et ANDERSON, R. S. (2000). The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation : phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environmental Research*, 83(1):72–8.
- BAKER, S. M. et MANN, R. (1994). Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 181(2):239–253.
- BATTAGLIN, W. A., KOLPIN, D. W., SCRIBNER, E. A., KUIVILA, K. M. et SANDSTROM, M. W. (2005). Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 20021. *Journal of the American Water Resources Association*, 41(2):323–332.
- BAUDRIMONT, M., SCHÄFER, J., MARIE, V., MAURY-BRACHET, R., BOSSY, C., BOUDOU, A. et BLANC, G. (2005). Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). *The Science of the Total Environment*, 337(1-3):265–80.

- BAUMARD, P., BUDZINSKI, H. et GARRIGUES, P. (1998a). PAHs in Arcachon bay, France : Origin and biomonitoring with caged organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 36(8):577–586.
- BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., GARRIGUES, P., SORBE, J., BURGEOT, T. et BELLOCQ, J. (1998b). Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, 36(12):951–960.
- BAYLIS, A. D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide : strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, 56(4):299–308.
- BEIRAS, R. et HIS, E. (1994). Effects of dissolved mercury on embryogenesis , survival , growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 113:95–103.
- BEIRAS, R. et HIS, E. (1995). Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* Embryos. *Marine Pollution Bulletin*, 30(1):47–49.
- BEIRAS, R. et WIDDOWS, J. (1995). Induction of metamorphosis in larvae of the oyster *Crassostrea gigas* using neuroactive compounds. *Marine Biology*, 123(2):327–334.
- BENINGER, P. G., LE PENNEC, G. et LE PENNEC, M. (2003). Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *The Biological Bulletin*, 205:83–92.
- BERTHELIN, C., KELLNER, K. et MATHIEU, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3):359–69.
- BEVELANDER, G. (1988). *Abalone, gross and fine structure*. Boxwood press, Pacific Grove.
- BINELLI, A., BACHETTA, R., VAILATI, G. et PROVINI, A. (2001). DDT contamination in Lake Maggiore ( N . Italy ) and effects on zebra mussel spawning. *Chemosphere*, 45:409–415.
- BLABER, S. J. M. (1970). The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Journal of Molluscan Studies*, 39(2-3):231–233.

- BLANCHOU, H., MOREAU-GUIGON, E., FARRUGIA, F., CHEVREUIL, M. et MOUCHEL, J. M. (2007). Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. *The Science of the Total Environment*, 375(1-3):168–79.
- BOCQUENÉ, G., ROIG, A. et FOURNIER, D. (1997). Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). *FEBS Letters*, 407(3):261–266.
- BODIN, N., BURGEOT, T., STANISIÈRE, J. Y., BOCQUENÉ, G., MENARD, D., MINIER, C., BOUTET, I., AMAT, A., CHEREL, Y. et BUDZINSKI, H. (2004). Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology and Toxicology*, 138(4):411–27.
- BOTTA, F., LAVISON, G., COUTURIER, G., ALLIOT, F., MOREAU-GUIGON, E., FAUCHON, N., GUERY, B., CHEVREUIL, M. et BLANCHOU, H. (2009). Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere*, 77(1):133–139.
- BOUILLY, K., BONNARD, M., GAGNAIRE, B., RENAULT, T. et LAPÈGUE, S. (2007). Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 52(1):58–63.
- BOUILLY, K., LEITÃO, A., MCCOMBIE, H. et LAPÈGUE, S. (2003). Impact of atrazine on aneuploidy in pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1):219–23.
- BOUILLY, K., MCCOMBIE, H., LEITÃO, A. et LAPÈGUE, S. (2004). Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 145(4):699–705.
- BOUKI, E., DIMITRIADIS, V. K., KALOYIANNI, M. et DAILIANIS, S. (2013). Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. *Marine environmental research*, 85:13–20.
- BOULAND, S., ROYER, S., MONTIEL, A. et WELTÉ, B. (2010). Analyse en ligne de pesticides et de leurs métabolites dans la Seine et étude de leur dégradation au cours du traitement. *Journal Européen d'Hydrologie*, 29(1):79–87.
- BOUTET, I., TANGUY, A. et MORAGA, D. (2004). Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma

- classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Marine Biology*, 146(1):53–64.
- BOYDEN, C. R., WATLING, H. et THORNTON, I. (1975). Effect of zinc on the settlement of the oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 31(3):227–234.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248–54.
- BRAUNBECK, T. et APPELBAUM, S. (1999). Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally by ultra-low doses of endosulfan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36:183–200.
- BRAUSCH, J. M., BEALL, B. et SMITH, P. N. (2007). Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78(6):510–514.
- BRAUSCH, J. M. et SMITH, P. N. (2007). Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(2):217–221.
- BRERETON, A., LORD, H., THORNTON, I. et WEBB, J. S. (1973). Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 19(2):96–101.
- BRINGOLF, R. B., COPE, W. G., MOSHER, S., BARNHART, M. C. et SHEA, D. (2007). Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(10):2094–2100.
- BUDZINSKI, H. et FORGET-LERAY, J. (2008). Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique. Rapport technique.
- BUISSON, S., BOUCHART, V., GUERLET, E., MALAS, J. P. et COSTIL, K. (2008). Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43(8):655–664.
- BURGEOT, T., GAGNAIRE, B., RENAULT, T., HAURE, J., MORAGA, D., DAVID, E., BOUTET, I., SAURIAU, MALET, N., BOUCHET, V., LE ROUX, F., LAPÈGUE, S., BOUILLY, K.,

- LE MOUILLAC, G., ARZUL, I., KNOERY, J., QUINIOU, F., BACHER, C. et SOLETSCHNIK, P. (2008). Les risques associés au stress environnementale. In SAMAIN, J.-F. et MC-COMBIE, H., éditeurs : *Summer Mortality of Pacific Oyster Crassostrea gigas*, chapitre 3, pages 95–139. Versailles, France, quae édition.
- BUROKER, N. E. (1983). Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia*, 23(2):271–279.
- BUSHEK, D., HEIDENREICH, M. et PORTER, D. (2007). The effects of several common anthropogenic contaminants on proliferation of the parasitic oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Marine Environmental Research*, 64(4):535–40.
- CACHOT, J., GEFFARD, O., AUGAGNEUR, S., LACROIX, S., LE MENACH, K., PELUHET, L., COUTEAU, J., DENIER, X., DEVIER, M., POTTIER, D. et BUDZINSKI, H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*, 79(3):257–267.
- CANESI, L., BORCHI, C., CIACCI, C., FABBRI, R., LORUSSO, L. C., VERGANI, L., MARCOMINI, A. et POIANA, G. (2008). Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquatic Toxicology*, 87(4):272–9.
- CANTILLO, A. (1998). Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with Worldwide Mussel Watch Studies. *Marine Pollution Bulletin*, 36(9):712–717.
- CANTY, M. N., HAGGER, J. a., MOORE, R. T. B., COOPER, L. et GALLOWAY, T. S. (2007). Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 54(4):396–402.
- CARPENTIER, S., MOILLERON, R., BELTRAN, C., HERVÉ, D. et THÉVENOT, D. (2002). Quality of dredged material in the river Seine basin (France). II. Micropollutants. *Science of The Total Environment*, 299(1–3):57–72.
- CASTRO, M., SANTOS, M. M., MONTEIRO, N. M. et VIEIRA, N. (2004). Measuring lysosomal stability as an effective tool for marine coastal environmental monitoring. *Marine Environmental Research*, 58(2-5):741–5.
- CEYHUN, S. B., AKSAKAL, E., KIRIM, B., ATABEYOGLU, K. et ERDOGAN, O. (2012). Chronic toxicity of pesticides to the mRNA expression levels of metallothioneins

- and cytochrome P450 1A genes in rainbow trout. *Toxicology and industrial health*, 28(2):162–9.
- CHANG, S.-j., TSENG, S.-m. et CHOU, H.-y. (2005). Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two bivalves : a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *zoological Studies*, 44(1):144–152.
- CHAPMAN, P. M. et MORGAN, J. D. (1983). Sediment bioassays with oyster larvae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 31(4):438–44.
- CHEMICAL ABSTRACT SERVICE (2013). CAS. <https://www.cas.org/> (last access : October 2013).
- CHENG, W., HSIAO, I.-S., HSU, C.-H. et CHEN, J.-C. (2004). The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor* supertexta and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology*, 17:295–306.
- CHEUNG, V. V., JHA, A., OWEN, R., DEPLEDGE, M. H. et GALLOWAY, T. S. (2006). Development of the in vivo chromosome aberration assay in oyster (*Crassostrea gigas*) embryo–larvae for genotoxicity assessment. *Marine Environmental Research*, 62, Supple(0):S278–S282.
- CHEVREUIL, M., BLANCHARD, M., TEIL, M.-J., CARRU, A.-M., TESTARD, P. et CHESTERIKOFF, A. (1996). Evaluation of the pollution by organochlorinated compounds (polychlorobiphenyls and pesticides) and metals (Cd, Cr, Cu and Pb) in the water and in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha pallas*) of the river Seine. *Water, Air, and Soil Pollution*, 88(3-4):371–381.
- CHEVREUIL, M., CARRU, a. M., CHESTERIKOFF, A., BOËT, P., TALES, E. et ALLARDI, J. (1995). Contamination of fish from different areas of the river Seine (France) by organic (PCB and pesticides) and metallic (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) micropollutants. *The Science of the Total Environment*, 162(1):31–42.
- CHO, S.-M. et JEONG, W.-G. (2005). Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 244(1-4):383–387.
- CHU, F.-L. E., VOLETY, A. K., HALE, R. C. et HUANG, Y. (2002). Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. *Marine Environmental Research*, 53(1):17–35.

- CHUNG, K. W., FULTON, M. H. et SCOTT, G. I. (2007). Use of the juvenile clam, *Mercenaria mercenaria*, as a sensitive indicator of aqueous and sediment toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3):333–40.
- CLAVIER, J. et RICHARD, O. (1986). Estimation du stock naturel d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) dans la région de Saint-Malo. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 48(3):95–105.
- CNC (2010). Comité National de la Conchyliculture. <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx> (last access : October 2013).
- COCHENNEC-LAUREAU, N., BAUD, J. P., BEDIER, E., BOUDRY, P., HUVET, A., NICOLAS, J. L., PETTON, J. F. et PEPIN, B. (2010). Bilan des « Journées Surmortalité des huîtres creuses , *Crassostrea gigas* » du Programme P7 « Aquaculture Durable » des 8 et 9 décembre 2009. Rapport technique.
- COLAS, S. (2011). Pollutions et qualité du milieu marin. In *Environnement littoral et marin. Service de l'observation et des statistiques (SOeS).*, chapitre V, pages 103–128.
- COLLIN, H., MEISTERTZHEIM, A.-L., DAVID, E., MORAGA, D. et BOUTET, I. (2010). Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. *The Journal of Experimental Biology*, 213(Pt 23):4010–7.
- COMMISSARIAT GÉNÉRAL AU DÉVELOPPEMENT DURABLE (2010). Les pesticides dans les milieux aquatiques ; données 2007. Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer. Rapport technique.
- COMMISSARIAT GÉNÉRAL AU DÉVELOPPEMENT DURABLE (2013). Contamination des cours d'eau par les pesticides en 2011. Rapport technique.
- COMPS, M. (1970). La maladie des branchies chez les huitres du genre *Crassostrea* caractéristiques et evolution des alterations processus de cicatrisation. *Revue des Travaux de l'institut des Pêches Maritimes*, 34(1):23–44.
- CONTARDO-JARA, V., KLINGELMANN, E. et WIEGAND, C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157(1):57–63.
- COOK, P. et GORDON, R. H. (2010). World Abalone supply, markets, and pricing. *Journal of Shellfish Research*, 29(3):569–571.

- COON, S. et BONAR, D. (1987). Pharmacological evidence that alpha1-adrenoceptors mediate metamorphosis of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Neuroscience*, 23(3): 1169–1174.
- COON, S. L., BONAR, D. B. et WEINER, R. M. (1985). Induction of settlement and metamorphosis of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 94(1-3):211–221.
- COSTIL, K. (2010). Habilitation à Diriger des Recherches ( HDR ) : Écologie fonctionnelle en milieux aquatique : de l'écologie des Mollusques Gastéropodes dulçaquicoles à l'impact des pesticides sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.
- COSTIL, K., ROYER, J., ROPERT, M., SOLETSCHNIK, P. et MATHIEU, M. (2005). Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgoland Marine Research*, 59(4):286–300.
- CSERHÁTI, T. (1995). Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants : interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environmental Health Perspectives*, 103(4):358–64.
- da SILVA, A. Z., ZANETTE, J., FERNANDO FERREIRA, J., GUZENSKI, J. a., MARQUES, M. R. F. et BAINY, A. C. D. (2005). Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(3):376–82.
- DAILIANIS, S., DOMOUHTSIDOU, G. P., RAFTOPOULOU, E., KALOYIANNI, M. et DIMITRIADIS, V. K. (2003). Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56(4):443–70.
- DAMIENS, G., GNASSIA-BARELLI, M., LOQUÈS, F., ROMÉO, M. et SALBERT, V. (2007). Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66(3):574–83.
- DAMIENS, G., HIS, E., GNASSIA-BARELLI, M., QUINIOU, F. et ROMÉO, M. (2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology and Toxicology*, 138(2):121–128.



- DANIS, B., DEBACKER, V., MIRANDA, C. T. et DUBOIS, P. (2006). Levels and effects of PCDD/Fs and co-PCBs in sediments, mussels, and sea stars of the intertidal zone in the southern North Sea and the English Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2):188–200.
- de los RÍOS, A., JUANES, J. a., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., LÓPEZ DE ALDA, M., BARCELÓ, D. et CAJARAVILLE, M. P. (2012). Assessment of the effects of a marine urban outfall discharge on caged mussels using chemical and biomarker analysis. *Marine Pollution Bulletin*, 64(3):563–73.
- DE MORA, S., FOWLER, S. W., TOLOSA, I., VILLENEUVE, J.-P. et CATTINI, C. (2005). Chlorinated hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and Gulf of Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 50(8):835–849.
- DÉGREMONT, L. (2003). *Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Université de Caen basse-Normandie.
- DEISSEROTH, A. et DOUNCE, A. L. (1970). Catalase : Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological reviews*, 50(3):319–75.
- DELAPORTE, M. (2005). *Modulation des paramètres hemocytaires par la nutrition chez l'huître creuse Crassostrea gigas. Implication dans les mortalités estivales*. Thèse de doctorat.
- DEVOS, A., VOISEUX, C., CAPLAT, C. et FIEVET, B. (2012). Effect of chronic exposure to zinc in young spats of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(12):2841–2847.
- DOMART-COULON, I., AUZOUX-BORDENAVE, S., DOUMENC, D. et KHALANSKI, M. (2000). Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures. *Toxicology in Vitro*, 14(3):245–251.
- DOMART-COULON, I., DOUMENC, D., AUZOUX-BORDENAVE, S. et FICHANT, Y. (1994). Identification of media supplements that improve the viability of primarily cell cultures of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology*, 16(2):109–120.
- DOMOUHTSIDOU, G. P., DAILIANIS, S., KALOYIANNI, M. et DIMITRIADIS, V. K. (2004). Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers. Combination with trace metal concentrations. *Marine Pollution Bulletin*, 48(5-6):572–86.

- DONAGHY, L., HONG, H.-K., LAMBERT, C., PARK, H.-S., SHIM, W. J. et CHOI, K.-S. (2010). First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish & shellfish immunology*, 28(1):87–97.
- DONDERO, F., NEGRI, A., BOATTI, L., MARSANO, F., MIGNONE, F. et VIARENGO, A. (2010). Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *The Science of the Total Environment*, 408(18):3775–86.
- DU, Y., ZHANG, L., XU, F., HUANG, B., ZHANG, G. et LI, L. (2013). Validation of house-keeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(3):939–945.
- ENDICOTT, J. A. et LING, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual review of biochemistry*, 58:137–71.
- ENRÍQUEZ-DÍAZ, M. R. (2004). *Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale.
- ERDOĞAN, O., CEYHUN, S. B., EKINCI, D. et AKSAKAL, E. (2011). Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. *Gene*, 484(1-2):13–7.
- EUFEMIA, N. et EPEL, D. (1998). The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and non-substrates : Implications for a general stress response. *Marine Environmental Research*, 46(1-5):401–405.
- EUROSTAT (2012). Sales of pesticides (tonnes of active ingredient). <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do> (last access : october 2013).
- EVARD, E., MARCHAND, J., THERON, M., PICHAVANT-RAFINI, K., DURAND, G., QUINIOU, L. et LAROCHE, J. (2010). Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology and Toxicology*, 152(3):321–31.
- FANG, Y., YANG, H., LIU, B. et ZHANG, L. (2013). Transcriptional response of lysozyme, metallothionein, and superoxide dismutase to combined exposure to heavy metals

- and bacteria in *Macrta veneriformis*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 157(1):54–62.
- FAO (2010). [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/fr](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/fr) (last access : october 2013).
- FAO (2013). <http://data.fao.org/fr/dataset?entryId=5e70fee4-fb65-43b6-8da1-b6de4626b9bd> . (last access : october 2013).
- FARCY, E. (2006). *Étude de l'impact des radionucléides rejetés par les installations nucléaires du nord cotentin sur l'huitre creuse Crassostrea gigas. Analyse de l'expression de marqueurs de moléculaires de stress*. Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie.
- FARCY, E., VOISEUX, C., LEBEL, J.-M. et FIEVET, B. (2007). Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *The Science of the Total Environment*, 374(2-3):328–41.
- FERNANDES, M. B., SICRE, M.-A., BOIREAU, A. et TRONCZYNSKI, J. (1997). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 34(11):857–867.
- FISHER, W. S. (2004). Antimicrobial activity of copper and zinc accumulated in eastern oyster amebocytes. *Journal of Shellfish Research*, 23:321–351.
- FISHER, W. S., OLIVER, L. M., WINSTEAD, J. T. et LONG, E. R. (2000). A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida : associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology*, 51(1):115–38.
- FISHTECH (2013). <http://www.fishtech.com/farming.html> (last access : october 2013).
- FITT, W., COON, S. L., WALCH, M., WEINER, R., COLWELL, R. et BONAR, D. B. (1990). Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Marine Biology*, 106:389–394.
- FITZPATRICK, P. J., SHEEHAN, D. et LIVINGSTONE, D. R. (1995). Studies on isoenzymes of glutathione S-Transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. *Marine Environmental Research*, 39:241–244.
- FLETCHER, C. A., BUBB, J. M. et LESTER, J. N. (1995). Agricultural inputs of mecoprop to a salt marsh system : Its fate and distribution within the sediment profile. *Marine Pollution Bulletin*, 30(12):803–811.

- FLEURY, C., MARIN, F., MARIE, B., LUQUET, G., THOMAS, J., JOSSE, C., SERPENTINI, A. et LEBEL, J. M. (2008). Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata* : a histological and microstructural study. *Tissue cell*, 40:207–218.
- FOLMAR, L. C., SANDERS, H. O. et JULIN, A. M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8(3):269–278.
- FOX, W. M., CONNOR, L., COPPLESTONE, D., JOHNSON, M. S. et LEAH, R. T. (2001). The organochlorine contamination history of the Mersey estuary, UK, revealed by analysis of sediment cores from salt marshes. *Marine Environmental Research*, 51(3): 213–27.
- FOY, C. (1987). Adjuvants : terminology, classification, and mode of action. In CHOW, P., GRANT, P., HINSHALWOOD, A. et SIMUNDON, E., éditeurs : *Adjuvants and agrochemicals*, chapitre Adjuvants :, pages 1–15. Boca Raton, crc press édition.
- FUNES, V., ALHAMA, J., NAVAS, J. I., LÓPEZ-BAREA, J. et PEINADO, J. (2006). Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*, 139(2):214–23.
- GABE, M. (1968). *Techniques histologiques*.
- GAGNAIRE, B. (2005). *Étude des effets de polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse, Crassostrea gigas – Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thesis in biological oceanology and marine environment. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle.*
- GAGNAIRE, B., GAY, M., HUVET, A., DANIEL, J.-Y., SAULNIER, D. et RENAULT, T. (2007). Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge : in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology*, 84(1):92–102.
- GAGNAIRE, B., RENAULT, T., BOUILLY, K., LAPEGUE, S. et THOMAS-GUYON, H. (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current pharmaceutical design*, 9(2):193–9.
- GAGNAIRE, B., THOMAS-GUYON, H., BURGEOT, T. et RENAULT (2006). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes : screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, 22(1):1–14.

- GAGNAIRE, B., THOMAS-GUYON, H. et RENAULT, T. (2004). In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(4):501–512.
- GALLOWAY, T. S. et DEPLEDGE, M. H. (2001). Immunotoxicity in invertebrates : measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, 10(1):5–23.
- GALLOWAY, T. S., MILLWARD, N., BROWNE, M. a. et DEPLEDGE, M. H. (2002). Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 61(3-4):169–80.
- GARCIA, C., THÉBAULT, A., DÉGREMONT, L., ARZUL, I., MIOSSEC, L., ROBERT, M., CHOLLET, B., FRANÇOIS, C., JOLY, J.-P., FERRAND, S., KERDUDOU, N. et RENAULT, T. (2011). Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary research*, 42(1):73.
- GARCÍA-LAVANDEIRA, M., SILVA, A., ABAD, M., PAZOS, A. J., SÁNCHEZ, J. L. et LUZ PÉREZ-PARALLÉ, M. (2005). Effects of GABA and epinephrine on the settlement and metamorphosis of the larvae of four species of bivalve molluscs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(2):149–156.
- GASNIER, C., DUMONT, C., BENACHOUR, N., CLAIR, E., CHAGNON, M.-C. et SÉRALINI, G.-E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262(3):184–91.
- GAUME, B., BOURGOUGNON, N., AUZOUX-BORDENAVE, S., ROIG, B., LE BOT, B. et BEDOUX, G. (2012). In vitro effects of triclosan and methyl-triclosan on the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology and Toxicology*, 156(2):87–94.
- GEFFARD, A., GEFFARD, O., AMIARD, J. C., HIS, E. et AMIARD-TRIQUET, C. (2007). Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 53(1):57–65.
- GEFFARD, O., BUDZINSKI, H. et HIS, E. (2002). The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology*, 11(6):403–416.

- GÉRARD-MONNIER, D., ERDELMEIER, I., RÉGNARD, K., MOZE-HENRY, N., YADAN, J. C. et CHAUDIÈRE, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology*, 11(10):1176–83.
- GERECKE, A. C., SCHÄRER, M., SINGER, H. P., MÜLLER, S. R., SCHWARZENBACH, R. P., SÄGESSER, M., OCHSENBEIN, U. et POPOW, G. (2002). Sources of pesticides in surface waters in Switzerland : pesticide load through waste water treatment plants—current situation and reduction potential. *Chemosphere*, 48(3):307–315.
- GIESY, J. P., DOBSON, S. et SOLOMON, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup<sup>®</sup>herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167:35–120.
- GIESY, J. P. et GRANEY, R. L. (1989). Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia*, 188-189(1):21–60.
- GILBERT, S. F. (2003). *Developmental biology*. Sunderland, sinauer as édition.
- GOLDBERG, E. D. (1986). The mussel watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment*, 7:91–103.
- GORSKI, J. et NUGEGODA, D. (2006). Toxicity of trace metals to juvenile abalone, *Haliotis rubra* following short-term exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 77(5):732–40.
- GOURDON, I., GRICOURT, L., KELLNER, K., ROCH, P. et ESCOUBAS, J. M. (2000). Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA sequence*, 11(3-4):265–70.
- GRECO, L., PELLERIN, J., CAPRI, E., GARNEROT, F., LOUIS, S., FOURNIER, M., SACCHI, A., FUSI, M., LAPOINTE, D. et COUTURE, P. (2011). Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1):132–41.
- GRIZEL, H., COMPS, M., BONAMI, J., COUSSERANS, F., DUTHOIT, J. et LE PENNEC, M. A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Pêche. Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes*, 240:7–30.
- GROSBOIS, C., MEYBECK, M., HOROWITZ, A. et FICHT, A. (2006). The spatial and temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in Seine River floodplain deposits (1994-2000). *The Science of the Total Environment*, 356(1-3):22–37.

- GUÉZENNEC, L., ROMANA, L.-A., GOUJON, R. et MEYER, R. (1999). Seine-Aval : un estuaire et ses problèmes. Rapport technique.
- GUILHERME, S. G., SANTOS, M. A., BARROSO, C., GAIVÃO, I. et PACHECO, M. (2012). Differential genotoxicity of Roundup ® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*) : considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology*, 21(5):1381–90.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. et JAKOBY, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22):7130–7139.
- HAGGER, J. A., ATIENZAR, F. A. et JHA, A. N. (2005). Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 74(3):205–217.
- HAMON, P. Y. et TOURNIER, H. (1984). Évolution de la biomasse de mollusques en élevage dans l'étang de Thau de 1980 à 1984. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 48(1-2):33–44.
- HARRISON, I., WILLIAMS, G. M. et CARLICK, C. A. (2003). Enantioselective biodegradation of mecoprop in aerobic and anaerobic microcosms. *Chemosphere*, 53(5):539–49.
- HAUTON, C., HAWKINS, L. et HUTCHINSON, S. (1998). The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 119(4):619–623.
- HAYWARD, P. et RYLAND, J. (1995). Molluscs. In HAYWARD, P. et RYLAND, J., éditeurs : *Handbook of the marine fauna of North-West Europe*, chapitre 10, pages 484–628. Oxford, UK.
- HEDBERG, D. et WALLIN, M. (2010). Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicology in Vitro*, 24(3):795–802.
- HELM, M. M., BOURNE, N. et LOVATELLI, A. (2006). *Ecloserie de bivalves un manuel pratique*. Rome, fao édition.
- HESS, F. D. et FOY, C. L. (2000). Interaction of surfactants with plant cuticles. *Weed Technology*, 14(4):807–813.

- HEUDE BERTHELIN, C., LAISNEY, J., ESPINOSA, J., MARTIN, O., HERNANDEZ, G., MATHIEU, M. et KELLNER, K. (2001). Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebrate Reproduction & Development*, 40(1):79–86.
- HIS, E., BUDZINSKI, H., GEFFARD, O., BEIRAS, R. et HIS, E. (1997a). Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 320(10):797–803.
- HIS, E., HEYVANG, I., GEFFARD, O. et de MONTAUDOUIN, X. (1999). A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research*, 33(7):1706–1718.
- HIS, E. et SEAMAN, M. (1993). Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). In *ICES Marine Environmental Quality Committee*.
- HIS, E., SEAMAN, M. et BEIRAS, R. (1997b). A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, 31(2):351–355.
- HOARAU, P., GNASSIA-BARELLI, M., ROMEO, M. et GIRARD, J. P. (2001). Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3):523–9.
- HOOGHE, R., DEVOS, S. et HOOGHE-PETERS, E. (2000). Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences*, 66(26):2519–2525.
- HOOPER, C., DAY, R., SLOCOMBE, R., HANDLINGER, J. et BENKENDORFF, K. (2007). Stress and immune responses in abalone : limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology*, 22:363–379.
- HOWARD, D. W. et SMITH, C. S. (1983). Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F /NEC- 25. Rapport technique June.
- HOWE, C. M., BERRILL, M., PAULI, B. D., HELBING, C. C., WERRY, K. et VELDHOEN, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four north American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8):1928–1938.



- HUTCHINSON, T. H., SOLBE, J. et KLOPPER-SAMS, P. J. (1998). Analysis of the ecotoxic aquatic toxicity (EAT) database III — Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*, 36(1):129–142.
- IFREMER (2013). Introduction à la DCSMM - Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM). (last access : october 2013).
- IUMMATO, M. M., DI FIORI, E., SABATINI, S. E., CACCIATORE, L. C., COCHÓN, A. C., RÍOS DE MOLINA, M. D. C. et JUÁREZ, A. B. (2013). Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95:123–9.
- IVANKOVIĆ, D., PAVIĆIĆ, J., BEATOVIĆ, V., KLOBUCAR, R. S. et KLOBUCAR, G. I. V. (2010). Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, copper, and pentachlorophenol. *Environmental toxicology*, 25(2):198–211.
- JHA, A., HAGGER, J., HILL, S. et DEPLEDGE, M. (2000). Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBTO) : an integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species. *Marine Environmental Research*, 50(1–5):565–573.
- JOHNSTON, S. A. (1981). Estuarine dredge and fill activities : A review of impacts. *Environmental Management*, 5(5):427–440.
- KETATA, I., DENIER, X., HAMZA-CHAFFAI, A. et MINIER, C. (2008). Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology and Toxicology*, 147(3):261–70.
- KEY, P., CHUNG, K., SIEWICKI, T. et FULTON, M. (2007). Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(2):272–277.
- KIM, Y., POWELL, E. N., WADE, T. L. et PRESLEY, B. J. (2008). Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves : NOAA Status and Trends 'Mussel Watch' Program. *Marine Environmental Research*, 65(2):101–27.
- KLUYTMANS, J., BRANDS, F. et ZANDEE, D. (1988). Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research*, 24(1-4):189–192.

- KOLPIN, D. W., THURMAN, E. M., LEE, E. A., MEYER, M. T., FURLONG, E. T. et GLASSMEYER, S. T. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *The Science of the Total Environment*, 354(2-3):191–197.
- KOPP, D., LE BRIS, H., GRIMAUD, L., NÉROT, C. et BRIND'AMOUR, A. (2013). Spatial analysis of the trophic interactions between two juvenile fish species and their preys along a coastal–estuarine gradient. *Journal of Sea Research*, 81:40–48.
- KURT-KARAKUS, P. B., BIDLEMAN, T. F., MUIR, D. C. G., STRUGER, J., SVERKO, E., CAGAMPAN, S. J., SMALL, J. M. et JANTUNEN, L. M. (2010). Comparison of concentrations and stereoisomer ratios of mecoprop, dichlorprop and metolachlor in Ontario streams, 2006-2007 vs. 2003-2004. *Environmental Pollution*, 158(5):1842–9.
- KUSTER, M., LÓPEZ DE ALDA, M. J., HERNANDO, M. D., PETROVIC, M., MARTÍN-ALONSO, J. et BARCELÓ, D. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358(1-2):112–123.
- LAGADIC, L., CAQUET, T. et AMIARD, J.-C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In LAGADIC, L., CAQUET, T., AMIARD, J.-C. et RAMADE, F., éditeurs : *Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux.*, pages 1–9. Paris, masson édition.
- LAMBERT, C., SOUDANT, P., DÉGREMONT, L., DELAPORTE, M., MOAL, J., BOUDRY, P., JEAN, F., HUVET, A. et SAMAIN, J.-F. (2007). Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture*, 270(1-4):276–288.
- LARTAUD, F., LANGLET, D., DE RAFELIS, M., EMMANUEL, L. et RENARD, M. (2006). Mise en évidence de rythmicité saisonnière dans la coquille des huîtres fossiles *Crassostrea aginensis* Tournouer, 1914 (Aquitaniens) et *Ostrea bellovacina* Lamarck, 1806 (Thanétien). Approche par cathodoluminescence et par sclérochronologie. *Geobios*, 39(6):845–852.
- LARVOR-CARIO, H., PHILIP DE LABORIE, L., HUREAU, D., MUZELLEE, M.-L., DORANGE, G., DURAND, G. et DEVAUCHELLE, N. (2000). Etude expérimentale de l'effet de pesticides utilisés sur les bassins versants de la rade de Brest (diuron, MCPA, glyphosate) sur le développement embryonnaire et larvaire de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* - Validation de la méthode SIRIS en mil. Rapport technique.

- LATIRE, T., LE PABIC, C., MOTTIN, E., MOTTIER, A., COSTIL, K., KOUETA, N., LEBEL, J.-M. et SERPENTINI, A. (2012). Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology*, 109:213–221.
- LE PETIT, M. (2009). *Monographie et étude de la dynamique de population d'Haliotis tuberculata au Sénégal*. Thèse de doctorat, Faculté de médecine de Créteil.
- LEBEL, J. M., GIARD, W., FAVREL, P. et BOUCAUD-CAMOU, E. (1996). Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 86(1):67–72.
- LECOINTRE, G. et LE GUYADER, H. (2006). *Classification phylogénétique du vivant*. Paris, belin édition.
- LEE, M.-K., CHO, B.-Y., LEE, S.-J., KANG, J.-Y., JEONG, H. D., HUH, S. H. et HUH, M.-D. (2001). Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. *Aquaculture*, 201(3-4):199–209.
- LEUNG, K. M. et FURNESS, R. W. (2001). Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. *Chemosphere*, 44(3):321–5.
- LIBRALATO, G., LOSSO, C., ARIZZI NOVELLI, A., CITRON, M., DELLA SALA, S., ZANOTTO, E., CEPAK, F. et VOLPI GHIRARDINI, A. (2008). Ecotoxicological evaluation of industrial port of Venice (Italy) sediment samples after a decontamination treatment. *Environmental Pollution*, 156(3):644–650.
- LINDEN, E., BENGTSSON, B.-E., SVANBERG, O. et SUNDSTRÖM, G. (1979). The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*, 8(11-12):843–851.
- LINDGREN, A. s., SJÖSTRÖM, M. et WOLD, S. (1996). QSAR modelling of the toxicity of some technical non-ionic surfactants towards fairy shrimps. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 15(3):208–218.
- LONG, E. R. et CHAPMAN, P. M. (1985). A Sediment Quality Triad : Measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*, 16(10):405–415.

- LOOS, R., LOCORO, G. et CONTINI, S. (2010). Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS(2) analysis. *Water research*, 44(7):2325–35.
- LOWE, D. et FOSSATO, V. (2000). The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology*, 48(2-3):75–85.
- LOWE, D., SOVERCHIA, C. et MOORE, M. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology*, 33:105–112.
- LUBET, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pecténidés. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 23:387–548.
- LUNA-ACOSTA, A., RENAULT, T., THOMAS-GUYON, H., FAURY, N., SAULNIER, D., BUDZINSKI, H., LE MENACH, K., PARDON, P., FRUITIER-ARNAUDIN, I. et BUSTAMANTE, P. (2012). Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere*, 87(11):1335–1340.
- LYONS, B., PASCOE, C. et MCFADZEN, I. (2002). Phototoxicity of pyrene and benzo[a]pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 54(3–5):627–631.
- MAÑAS, F., PERALTA, L., RAVIOLO, J., GARCÍA OVANDO, H., WEYERS, a., UGNIA, L., GONZALEZ CID, M., LARRIPA, I. et GORLA, N. (2009). Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(3):834–7.
- MAI, H., CACHOT, J., BRUNE, J., GEFFARD, O., BELLES, A., BUDZINSKI, H. et MORIN, B. (2012). Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Pollution Bulletin*, 64(12):2663–70.
- MAILLET, M. (2006). *Biologie cellulaire*. Masson édition.
- MAMINDY-PAJANY, Y., GALGANI, F., ROMÉO, M., HUREL, C. et MARMIER, N. (2010). Minerals as additives for decreasing the toxicity of Mediterranean contaminated dredged sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7):1748–54.

- MAMINDY-PAJANY, Y., HUREL, C., GÉRET, F., GALGANI, F., BATTAGLIA-BRUNET, F., MARMIER, N. et ROMÉO, M. (2013). Arsenic in marine sediments from French Mediterranean ports : geochemical partitioning, bioavailability and ecotoxicology. *Chemosphere*, 90(11):2730–2736.
- MANN, R. M. et BIDWELL, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(2):193–199.
- MARTEIL, L. (1974). La conchyliculture française. 1<sup>re</sup> partie : Le milieu naturel et ses variations. *Revue des Travaux de l'institut des Pêches Maritimes*, 38(3):217–337.
- MARTENOT, C., ODEN, E., TRAVAILLÉ, E., MALAS, J. P. et HOUSSIN, M. (2010). Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods*, 170(1-2):86–9.
- MARTIN, M., OSBORNE, K. E., BILLIG, P. et GLICKSTEIN, N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 12(9):305–308.
- MARTIN-DIAZ, L., FRANZELLITTI, S., BURATTI, S., VALBONESI, P., CAPUZZO, A. et FABBRI, E. (2009). Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 94(3):177–85.
- MATOZZO, V., BALLARIN, L., PAMPANIN, D. M. et MARIN, M. G. (2001). Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 41(2):163–70.
- MAYCOCK, D., CRANE, M., ATKINSON, C. et JOHNSON, I. (2012). Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances : glyphosate (For consultation). Ed. Water Framework Directive – United Kingdom Technical Advisory Group (WFD-UKTAG)/SNIFFER, pp 121. <http://www.wfduk.org/sites/default/files/Media/Glyphosate>.
- MENG, P.-J., WANG, J.-T., LIU, L.-L., CHEN, M.-H. et HUNG, T.-C. (2005). Toxicity and bioaccumulation of tributyltin and triphenyltin on oysters and rock shells collected from Taiwan mariculture area. *The Science of the Total Environment*, 349(1-3):140–9.

- MESNAGE, R., BERNAY, B. et SÉRALINI, G.-E. (2012). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, (0).
- MEYBECK, M., LESTEL, L., BONTÉ, P., MOILLERON, R., COLIN, J. L., ROUSSELOT, O., HERVÉ, D., de PONTEVÈS, C., GROSBOIS, C. et THÉVENOT, D. R. (2007). Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950–2005). *Science of The Total Environment*, 375(1–3):204–231.
- MINIER, C., LELONG, C., DJEMEL, N., RODET, F., TUTUNDJIAN, R., FAVREL, P., MATHIEU, M. et LEBOULENGER, F. (2002). Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 54(3-5):455–9.
- MOHAMMED, A. (2013). Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults? In GOWDER, S., éditeur : *New Insights into Toxicity and Drug Testing*. InTech.
- MONBET, P. (2004). Dissolved and particulate fluxes of copper through the Morlaix river estuary (Brittany, France) : mass balance in a small estuary with strong agricultural catchment. *Marine Pollution Bulletin*, 48(1-2):78–86.
- MONBET, P. (2006). Mass balance of lead through a small macrotidal estuary : The Morlaix River estuary (Brittany, France). *Marine Chemistry*, 98(1):59–80.
- MONIRITH, I., UENO, D., TAKAHASHI, S., NAKATA, H., SUDARYANTO, A., SUBRAMANIAN, A., KARUPPIAH, S., ISMAIL, A., MUCHTAR, M., ZHENG, J., RICHARDSON, B. J., PRUDENTE, M., HUE, N. D., TANA, T. S., TKALIN, A. V. et TANABE, S. (2003). Asia-Pacific mussel watch : monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3):281–300.
- MOORE, M. N., ICARUS ALLEN, J. et MCVEIGH, A. (2006). Environmental prognostics : an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 61(3):278–304.
- MORTON, B. (1977). The tidal rhythm of feeding and digestion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 26: 135–151.

- MOTELAY-MASSEI, A., OLLIVON, D., GARBAN, B., TIPHAGNE-LARCHER, K. et CHEVREUIL, M. (2007). Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine estuary, France : mass balance and role of atmospheric deposition. *Hydrobiologia*, 588(1):145–157.
- MOTTIER, A., KIENTZ-BOUCHART, V., SERPENTINI, A., LEBEL, J. M., JHA, A. N. et COSTIL, K. (2013). Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 128–129(0):67–78.
- MOTTIN, E., CAPLAT, C., MAHAUT, M.-L., COSTIL, K., BARILLIER, D., LEBEL, J.-M. et SERPENTINI, A. (2010). Effect of in vitro exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish & shellfish immunology*, 29(5):846–53.
- MOULLAC, G. L., QUÉAU, I., SOUCHU, P. L., POUVREAU, S., RENÉ, J., COZ, L. et SAMAIN, J. F. (2007). Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and temperature. *Marine Biology Research*, 3(5):357–366.
- MUNARON, D. (2004). *Etude des apports en herbicides et en nutriments par la Charente : Modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron*. Thèse de doctorat.
- MUNARON, D., DUBERNET, J.-f., DELMAS, F. et STANISIÈRE, J.-y. (2006). Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron bay. *Cahiers de biologie marine*, 47(October 2005):85–92.
- MUNARON, D., TAPIE, N., BUDZINSKI, H., ANDRAL, B. et GONZALEZ, J.-L. (2012). Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters : Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 114:82–92.
- MUNSCHY, C., HÉAS-MOISAN, K. et METAYER, E. (2010). Niveaux de présence de contaminants émergents dans le milieu marin. PCDD/F, PBDE, HBCD dans les mollusques marins. Rapport technique, ONEMA-IFREMER, Nantes.
- NEDELEC, F., DAGNEAUX, D., LEJOLIVET, A., FIAIT, L., ETOURNEAU, C., RIOU, P., FONTAINE, B., FRANCOISE, S., JACQUELINE, F., JUSTOME, V., MAHEUX, F., PIERRE, O., RABILLER, E. et LESAULNIER, N. (2012). Réseau Hydrologique Littoral Normand. Année 2010. Rapport scientifique.

- NÍ SHÚILLEABHÁIN, S., MOTHERSILL, C., SHEEHAN, D., O'BRIEN, N. M., O' HALLORAN, J., van PELT, F. N. a. M., KILEMADE, M. et DAVOREN, M. (2006). Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3):332–41.
- NICE, H. E., THORNDYKE, M. C., MORRITT, D., STEELE, S. et CRANE, M. (2000). Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin*, 40(6):491–496.
- NITSCHKE, L., WILK, A., SCHÜSSLER, W., METZNER, G. et LIND, G. (1999). Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides. *Chemosphere*, 39(13):2313–2323.
- ODEN, E., MARTENOT, C., BERTHAUX, M., TRAVAILLÉ, E., MALAS, J. et HOUSSIN, M. (2011). Quantification of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in *Crassostrea gigas* by real-time PCR : Determination of a viral load threshold to prevent summer mortalities. *Aquaculture*, 317(1-4):27–31.
- OECD (2013). [http ://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSEIDS/1570645.pdf](http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSEIDS/1570645.pdf) (last access : october 2013). Rapport technique.
- OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION (2008). Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing council directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC,.
- OH, K. H. et TUOVINEN, O. H. (1991). Bacterial degradation of phenoxy herbicide mixtures 2,4-D and MCPP. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2):222–229.
- OLIVIER, A. (2008). Homme et littoral : les liaisons houleuses. [http ://www2.cnrs.fr/journal/3491.htm](http://www2.cnrs.fr/journal/3491.htm) . (page consultée en juillet 2013).
- ORP (2013). Observatoire des résidus de pesticides. [http ://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=534](http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=534). (page consultée en juillet 2013).
- ORTIZ-ZARRAGOITIA, M. et CAJARAVILLE, M. P. (2006). Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(3):361–9.
- OZRETIĆ, B. et KRAJNOVIĆ-OZRETIĆ, M. (1992). Esterase heterogeneity in mussel *Mytilus galloprovincialis* : effects of organophosphate and carbamate pesticides in vitro.



- Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology and Toxicology*, 103(1):221–5.
- PAILLARD, C. (2004). Rôle de l'environnement dans les interactions hôte-pathogène : développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Synthèse des travaux de recherche (1987-2004). *Rapport d'Habilitation à Diriger des Recherches*.
- PAIN, S. et PARANT, M. (2003). Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. *Comptes Rendus Biologies*, 326(7):659–672.
- PANDIT, G. G., SAHU, S. K., SHARMA, S. et PURANIK, V. D. (2006). Distribution and fate of persistent organochlorine pesticides in coastal marine environment of Mumbai. *Environment International*, 32(2):240–3.
- PÄRT, P., SVANBERG, O. et BERGSTRÖM, E. (1985). The influence of surfactants on gill physiology and cadmium uptake in perfused rainbow trout gills. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9(2):135–144.
- PARTEARROYO, M., PILLING, S. et JONES, M. (1991). The lysis of isolated fish (*Oncorhynchus mykiss*) gill epithelial cells by surfactants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology*, 100(3):381–388.
- PEIXOTO, F. (2005). Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, 61(8):1115–1122.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J. et TREMBLAY, R. (1998). La fragilité lysosomale en tant que biomarqueur cytologique. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, pages 230–231. Lavoisier édition.
- PERA-TITUS, M., GARCIA-MOLINA, V., BAÑOS, M. A., GIMÉNEZ, J. et ESPLUGAS, S. (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes : a general review. *Applied Catalysis B : Environmental*, 47(4):219–256.
- PESCE, S., FAJON, C., BARDOT, C., BONNEMOY, F., PORTELLI, C. et BOHATIER, J. (2008). Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquatic Toxicology*, 86(3):352–60.
- PICHOT, Y., COMPS, M., TIGE, G., GRIZEL, H. et RABOUIN, M.-A. (1980). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'institut des Pêches Maritimes*, 43(1):131–140.

- PIENIAŻEK, D., BUKOWSKA, B. et DUDA, W. (2004). Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79(2):58–63.
- POËY, J. et PHILIBERT, C. (2000). Toxicité des métaux. *Revue Française des Laboratoires*, 323:35–43.
- POIRIER, L., QUINIOU, F., RUIZ, N., MONTAGU, M., AMIARD, J.-C. et POUCHUS, Y. F. (2007). Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic toxicology*, 83(4):254–62.
- PPDB (2013). Pesticide Properties Database. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm> (last access : october 2013).
- PUÉRTOLAS, L., DAMÁSIO, J., BARATA, C., SOARES, A. M. et PRAT, N. (2010). Evaluation of side-effects of glyphosate mediated control of giant reed (*Arundo donax*) on the structure and function of a nearby Mediterranean river ecosystem. *Environmental Research*, 110(6):556–564.
- QUINIOU, F., DAMIENS, G., GNASSIA-BARELLI, M., GEFFARD, A., MOUNEYRAC, C., BUDZINSKI, H. et ROMÉO, M. (2007). Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environment International*, 33(1):27–33.
- RANK, J., LEHTONEN, K. K., STRAND, J. et LAURSEN, M. (2007). DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic toxicology*, 84(1):50–61.
- RELYEA, R. A. (2005). The lethal impact of Roundup® on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15(4):1118–1124.
- RENAULT, T. (2006). Les virus infectant les bivalves marins. *Virologie*, 10:35–41.
- RENAULT, T. (2011). Effects of Pesticides on Marine Bivalves : What Do We Know and What Do We Need to Know ? In STOYTCHIEVA, M., éditeur : *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*, pages 228–240. Intech édition.
- REVANKAR, P. R. et SHYAMA, S. K. (2009). Genotoxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on an estuarine bivalve, *Meretrix ovum*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7):1618–1623.

- RINGWOOD, A., CONNERS, D. et KEPPLER, C. (1999). Cellular responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to metal-contaminated sediments. *Marine Environmental Research*, 48(4-5):427–437.
- RINGWOOD, A. H., CONNER, D. E. et DINOVOB, A. (1998). The Effects of Copper Exposures on Cellular Responses in Oysters. *Marine Environmental Research*, 46(1):591–595.
- RNO (2006). *Surveillance du Milieu Marin Edition 2006*. Ifremer et édition.
- ROBERT, R., HIS, E., MAURER, D. et HIS, E. (1986). Toxicité d'un desherbant, l'atrazine simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages, *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis*, 15:319–325.
- ROCCH (2013). [http ://envlit.ifremer.fr/ var/envlit/ storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/](http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/) (last access : october 2013).
- ROESIJADI, G., BRUBACHER, L. L., UNGER, M. E. et ANDERSON, R. S. (1997). Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 118(2):171–6.
- ROMÉO, M., HOARAU, P., GARELLO, G., GNASSIA-BARELLI, M. et GIRARD, J. P. (2003). Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 122(3):369–78.
- ROPERT, M., MAZURIÉ, J., BÉDIER, E., LE COZ, F. et SOLETSCHIK, P. (2008). Evaluation of summer mortality risk factors in shellfish farming ecosystems. In SAMAIN, J. et MCCOMBIE, H., éditeurs : *Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas. The Morest project*, pages 1–61. Versailles, ifremer/qu édition.
- ROYER, J., ROPERT, M. et COSTIL, K. (2007). Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Normandy (France). *Journal of Shellfish Research*, 26(4):973–984.
- ROYER, J., SEGUINEAU, C., PARK, K.-I., POUVREAU, S., CHOI, K.-S. et COSTIL, K. (2008). Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture*, 277(3-4):313–320.
- SAMAIN, J.-F. (2007). *Mortalités estivales de l'huître creuse Crassostrea gigas : défi Morest*. Editions Quae.

- SAMAIN, J.-F., DÉGREMONT, L., SOLETSCHNIK, P., HAURE, J., BÉDIER, E., ROPERT, M., MOAL, J., HUVET, A., BACCA, H., VAN WORMHOUDT, A., DELAPORTE, M., COSTIL, K., POUVREAU, S., LAMBERT, C., BOULO, V., SOUDANT, P., NICOLAS, J., LE ROUX, F., RENAULT, T., GAGNAIRE, B., GERET, F., BOUTET, I., BURGEOT, T. et BOUDRY, P. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, 268(1–4):227–243.
- SAUVÉ, S., BROUSSEAU, P., PELLERIN, J., MORIN, Y., SENÉCAL, L., GOUDREAU, P. et FOURNIER, M. (2002). Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves : in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic toxicology*, 58(3–4):189–200.
- SCHERRER, B. (1984). *Biostatistique*. Chicoutimi, gaëtan mor édition.
- SCHIRMER, K. (2006). Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology*, 224(3):163–83.
- SCHMIDT, A., WEHRMANN, A. et DITTMANN, S. (2008). Population dynamics of the invasive Pacific oyster *Crassostrea gigas* during the early stages of an outbreak in the Wadden Sea (Germany). *Helgoland Marine Research*, 62(4):367–376.
- SCHNITZLER, J. G., THOMÉ, J. P., LEPAGE, M. et DAS, K. (2011). Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. *Science of The Total Environment*, 409(19): 3680–3686.
- SCOTT, G. I., FULTON, M. H., WIRTH, E. F., CHANDLER, G. T., KEY, P. B., DAUGOMAH, J. W., BEARDEN, D., CHUNG, K. W., STROZIER, E. D., DELORENZO, M., SIVERTSEN, S., DIAS, A., SANDERS, M., MACAULEY, J. M., GOODMAN, L. R., LACROIX, M. W., THAYER, G. W. et KUCKLICK, J. (2002). Toxicological studies in tropical ecosystems : an ecotoxicological risk assessment of pesticide runoff in south Florida estuarine ecosystems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15):4400–4408.
- SERPENTINI, A., GHAYOR, C., PONCET, J. M., HEBERT, V., GALÉRA, P., PUJOL, J. P., BOUCAUD-CAMOU, E. et LEBEL, J. M. (2000). Collagen study and regulation of the de novo synthesis by IGF-I in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *The Journal of experimental zoology*, 287:275–284.

- SMINIA, T. (1981). Gastropods. In RATCLIFFE, N. et ROWLY, A., éditeurs : *Invertebrate blood cells*, pages 191–232. Academic Press, London, UK, academic p édition.
- SNAPE, J. R., MAUND, S. J., PICKFORD, D. B. et HUTCHINSON, T. H. (2004). Ecotoxicogenomics : the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 67:143–154.
- SOBRAL, P. et WIDDOWS, J. (1997). Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, 34(12):992–1000.
- SOCLO, H. H., GARRIGUES, P. H. et EWALD, M. (2000). Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ( PAHs ) in Coastal Marine Sediments : Case Studies in Cotonou ( Benin ) and Aquitaine ( France ) Areas. 40(5):387–396.
- SOKOLOVA, I. M., SUKHOTIN, A. A. et LANNIG, G. (2012). Stress effects on metabolism and energy budgets in mollusks. In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, chapitre 19. Wiley-Blackwell.
- SOLECHNIK, P., ROPERT, M., MAZURIÉ, J., GILDAS FLEURY, P. et LE COZ, F. (2007). Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture*, 271(1–4):384–400.
- SONG, L., LI, X., BOTT, K., WANG, T., CLARKE, S. et ZHAO, W. (2007a). Effects of air exposure on the lysosomal membrane stability of haemocytes in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach). *Aquaculture Research*, 38(3):239–245.
- SONG, L., LI, X., CLARKE, S., WANG, T. et BOTT, K. (2007b). The application of neutral red retention assay to evaluate the differences in stress responses to sexual maturation and spawning between different sizes of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Shellfish Research*, 26(2):493–499.
- SOS (SERVICE DE L'OBSERVATION ET DES STATISTIQUES) (2010). Les pesticides dans les milieux aquatiques ; données 2007. Ed. : Tregouet B., La Défense, 48 pp.
- STATHAM, P. J., LECLERCQ, S., HART, V., BATTE, M., AUGER, Y., WARTEL, M. et CHEFTEL, J. (1999). Dissolved and particulate trace metal fluxes through the central English Channel , and the influence of coastal gyres. *Continental Shelf Research*, 19:2019–2040.

- STEELE, S. et MULCAHY, M. (1999). Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(4):673–686.
- SYASINA, I., VASCHENKO, M. et ZHADAN, P. (1997). Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia : Pectinidae) from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Marine Environmental Research*, 44(1):85–98.
- TANGUY, A., BOUTET, I., LAROCHE, J. et MORAGA, D. (2005a). Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *The FEBS Journal*, 272(2):390–403.
- TANGUY, A., BOUTET, I. et MORAGA, D. (2005b). Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochimica et Biophysica acta*, 1681(2-3):116–25.
- THELLIN, O., ZORZI, W., LAKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, a. et HEINEN, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards : use and limits. *Journal of biotechnology*, 75(2-3):291–5.
- THOMAS-GUYON, H., GAGNAIRE, B., BADO-NILLES, A., BOUILLY, K., LAPÈGUE, S. et RENAULT, T. (2009). Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental and Comparative Immunology*, 33(5): 653–659.
- TIM-TIM, A. L. S., MORGADO, F., MOREIRA, S., RANGEL, R., NOGUEIRA, A. J. a., SOARES, A. M. V. M. et GUILHERMINO, L. (2009). Cholinesterase and glutathione S-transferase activities of three mollusc species from the NW Portuguese coast in relation to the 'Prestige' oil spill. *Chemosphere*, 77(11):1465–75.
- TOMLIN, C. D. S. (1997). The pesticide manual. British crop protection. Council : Farnham, U.K. Rapport technique.
- TRAVERS, M.-A. (2008). *Interaction de la bactérie Vibrio harveyi avec son hôte, l'ormeau Haliotis tuberculata : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale.
- TRAVERS, M.-A., BASUYAUX, O., LE GOÏC, N., HUCHETTE, S., NICOLAS, J.-L., KOKEN, M. et PAILLARD, C. (2009). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis*

- tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi* : an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology*, 15(6):1365–1376.
- TRAVERS, M.-A., MIRELLA DA SILVA, P., LE GOÏC, N., MARIE, D., DONVAL, A., HUCHETTE, S., KOKEN, M. et PAILLARD, C. (2008). Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 24:400–411.
- TSUI, M. T. K. et CHU, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations : comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7):1189–1197.
- UIPP (2012). Union des Industries de la Protection des Plantes. Rapport d'activité UIPP 2011/2012.[http ://www.uipp.org/Actualites/Legislation-et-reglementation/Actualite-francaise/Rapport-d-activite-UIPP-2011-2012-consulable-en-ligne](http://www.uipp.org/Actualites/Legislation-et-reglementation/Actualite-francaise/Rapport-d-activite-UIPP-2011-2012-consulable-en-ligne) (last access : October 2013).
- USHEVA, L. N., VASCHENKO, M. a. et DURKINA, V. B. (2006). Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(3):166–172.
- VAN DEN HURK, P. (1994). Effets of natural sediment properties on test results in bioassays with oyster larvae (*Crassostrea gigas*) on sediment elutriates. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3:185–191.
- VAN VALKENBURG, J. (1982). Terminology, classification, and chemistry. In *Adjuvants for herbicides*, chapitre Terminolog, pages 1–19. Illinois, weed scien édition.
- VASCONCELOS, R. P., REIS-SANTOS, P., TANNER, S., MAIA, A., LATKOCZY, C., GÜNTHER, D., COSTA, M. J. et CABRAL, H. (2008). Evidence of estuarine nursery origin of five coastal fish species along the Portuguese coast through otolith elemental fingerprints. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(2):317–327.
- VINDIMIAN, E. (2012). MSEXcel macro Regtox.7.0.6 freely available from Eric Vindimian, IRSTEA, France. [http ://www.normalesup.org/vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/vindimian/fr_index.html) (last access : October 2013).
- VINK, J. P. M. et VAN DER ZEE, S. E. A. T. M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters : multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research*, 31(11):2858–2868.

- WANG, G., LIU, B., TANG, B., ZHANG, T. et XIANG, J. (2006). Pharmacological and immunocytochemical investigation of the role of catecholamines on larval metamorphosis by  $\beta$ -adrenergic-like receptor in the bivalve *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*, 258(1–4):611–618.
- WANG, Q., WANG, X., WANG, X., YANG, H. et LIU, B. (2010). Analysis of metallothionein expression and antioxidant enzyme activities in *Meretrix meretrix* larvae under sublethal cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, 100(4):321–328.
- WATLING, H. R. (1983). Comparative study of the effects of metals on the settlement of *Crassostrea gigas*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(3):344–351.
- WEDDERBURN, J., MCFADZEN, I., SANGER, R., BEESLEY, A., HEATH, C., HORNSBY, M. et LOWE, D. (2000). The Field Application of Cellular and Physiological Biomarkers, in the Mussel *Mytilus edulis*, in Conjunction with Early Life Stage Bioassays and Adult Histopathology. *Marine Pollution Bulletin*, 40(3):257–267.
- WESSEL, N., ROUSSEAU, S., CAISEY, X., QUINIOU, F. et AKCHA, F. (2007). Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17[alpha]-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, 85(2):133–142.
- WHITHEHOUSE, P. et UK ENVIRONMENT AGENCY (2010). Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances : mecoprop. Rapport technique, Uk environment agency.
- WILLIAMS, G. M., KROES, R. et MUNRO, I. C. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31(2):117–165.
- WILLIAMS, L., CHAPMAN, P. M. et GINN, T. (1986). A comparative evaluation of marine sediment toxicity using bacterial luminescence, oyster embryo and amphipod sediment bioassays. *Marine Environmental Research*, 19(3):225–249.
- WIRTH, E. F., PENNINGTON, P. L., LAWTON, J. C., DELORENZO, M. E., BEARDEN, D., SHADDRIX, B., SIVERTSEN, S. et FULTON, M. H. (2004). The effects of the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. *Environmental Pollution*, 131(3):365–71.
- WITTMER, I. K., BADER, H.-P., SCHEIDEGGER, R., SINGER, H., LÜCK, A., HANKE, I.,



- CARLSSON, C. et STAMM, C. (2010). Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water research*, 44(9):2850–62.
- WOELKE, C. E. (1972). *Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (Crassostrea gigas) embryo*. Department of Fisheries, Management and Research Division, State of Washington.
- WOODBURN, A. T. (2000). Glyphosate : production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science*, 56(4):309–312.
- YEATS, P., GAGNÉ, F. et HELLOU, J. (2008). Body burden of contaminants and biological effects in mussels : an integrated approach. *Environment International*, 34(2):254–64.
- ZHANG, W., JIANG, F. et OU, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution : with China as a focus. In *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, volume 1, pages 125–144.
- ZHU, X., ZHOU, J. et CAI, Z. (2011). The toxicity and oxidative stress of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Marine Pollution Bulletin*, 63(5-12):334–8.



# ANNEXES



## **Annexe A**

# **Mesure des dérivés réactifs de l'oxygène par cytométrie en flux**

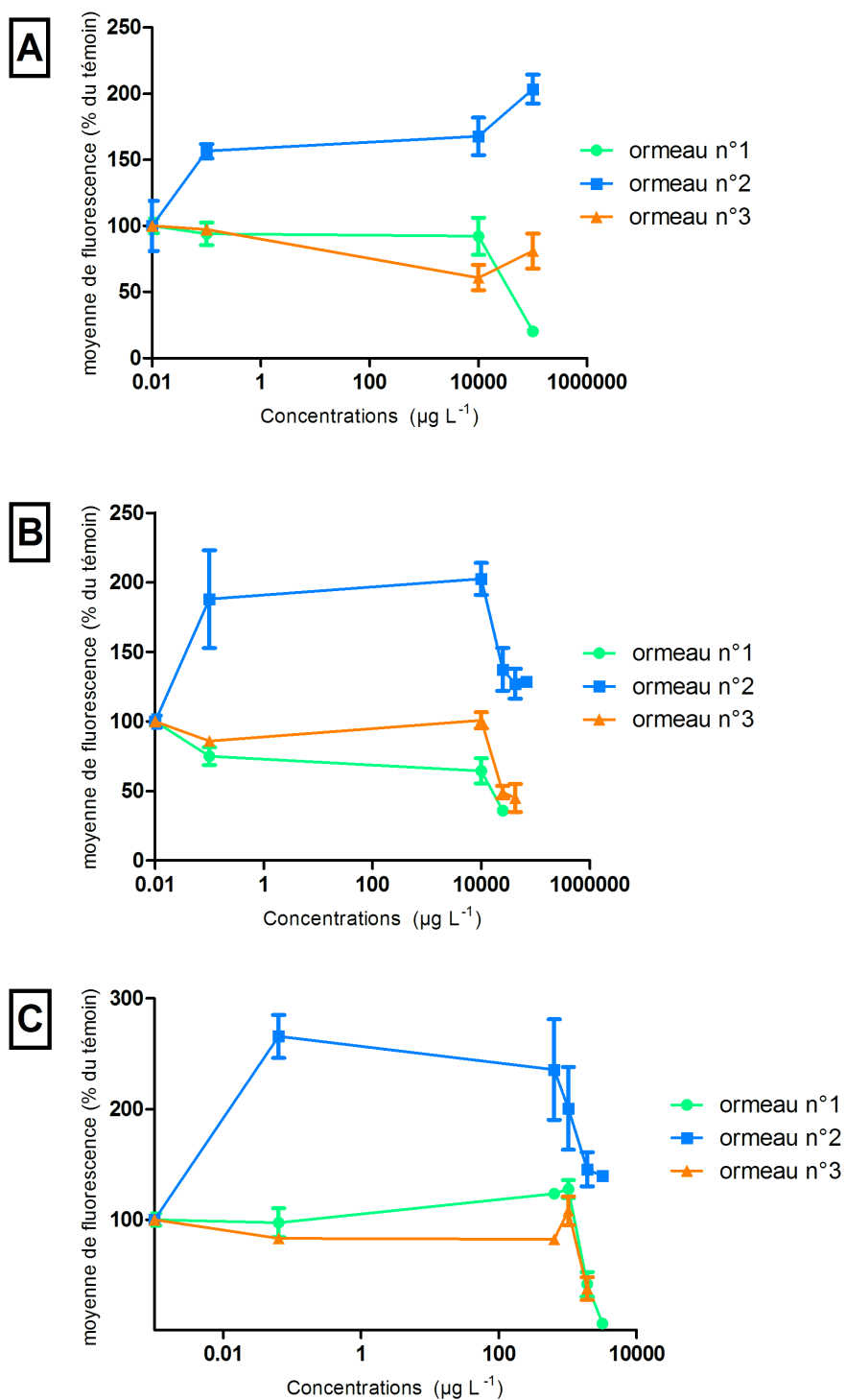


FIGURE A.1 – Moyenne ( $\pm$  SEM) de la fluorescence des cellules (en % du témoin) représentant la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène après exposition pendant 72h au glyphosate (A), Roundup Express® (B) et aux POEAs (C)

## **Annexe B**

**Ensemble des données de mesure de  
l'expression transcriptionnelle de gènes  
cibles.**

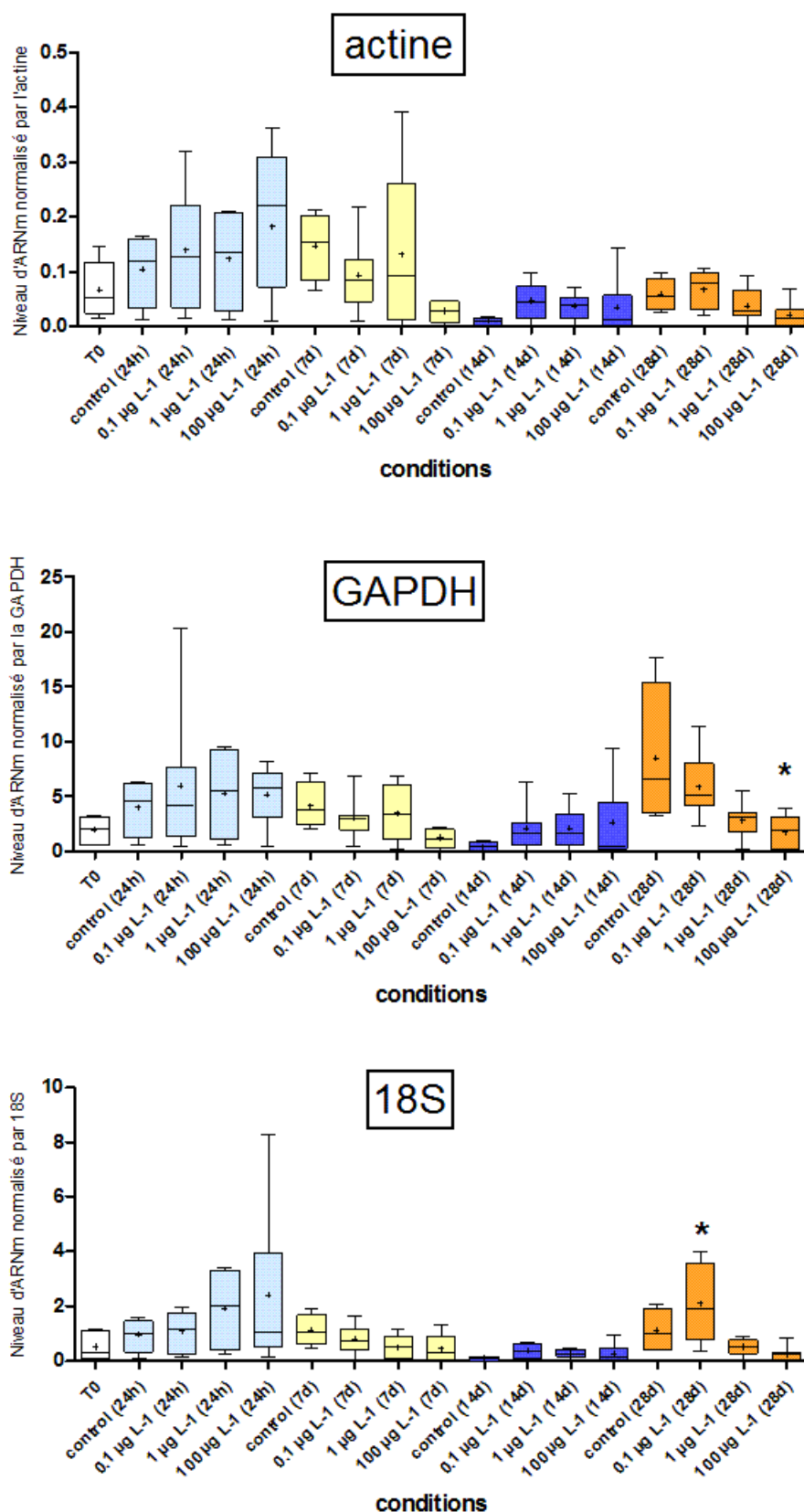


FIGURE B.1 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **HSC72** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).



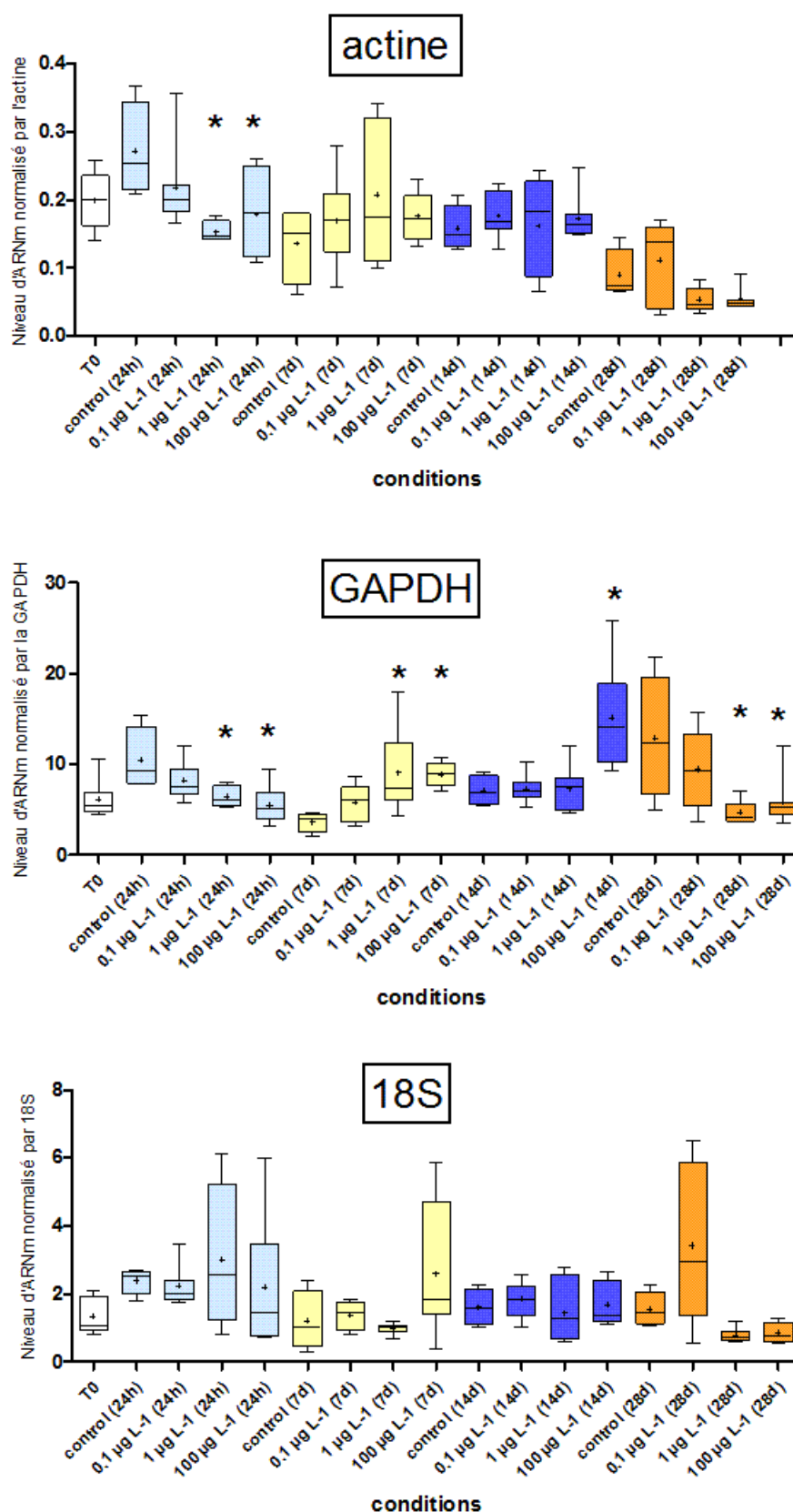


FIGURE B.2 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **HSP70** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).

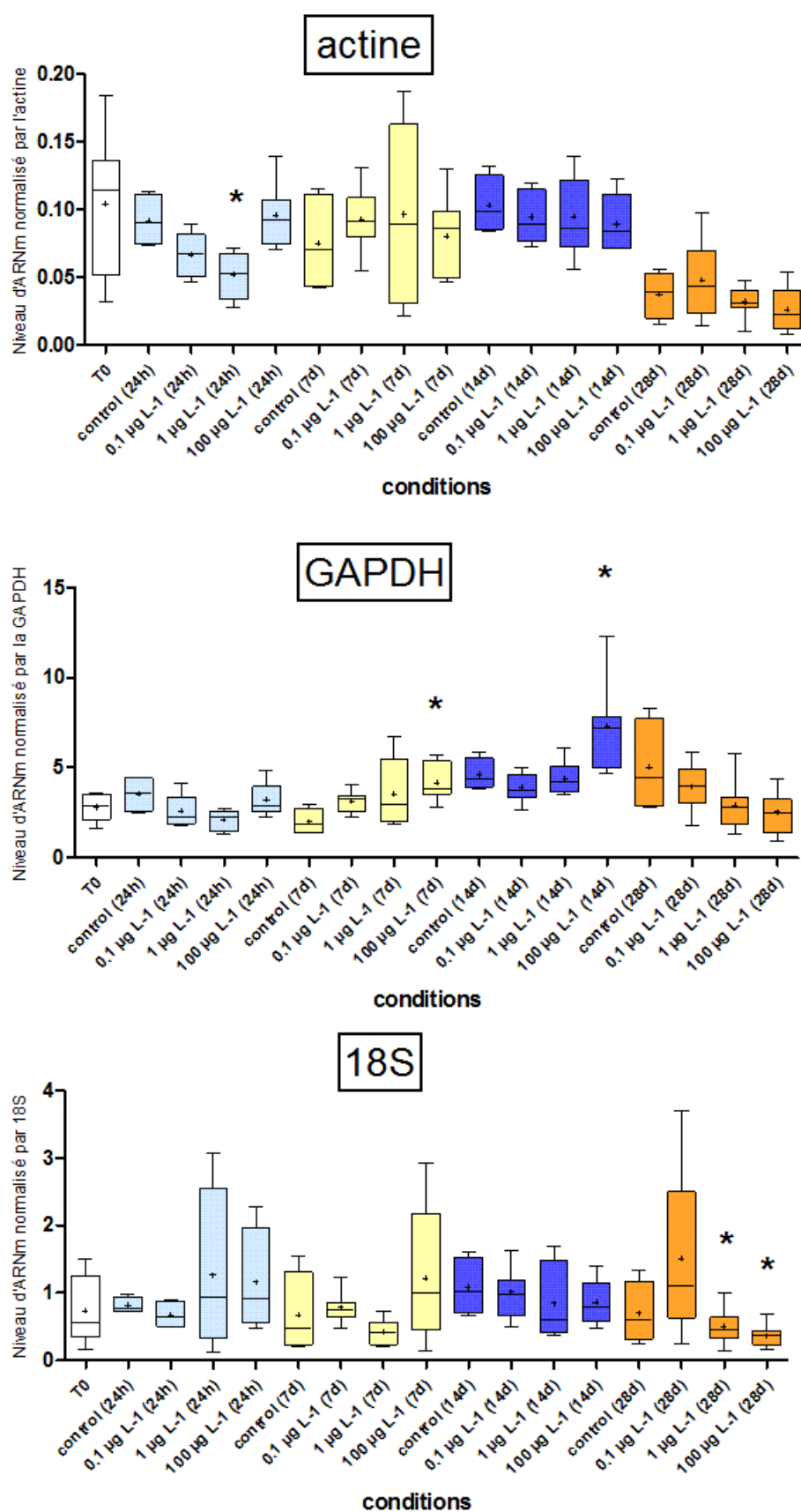


FIGURE B.3 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **HSP90** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).

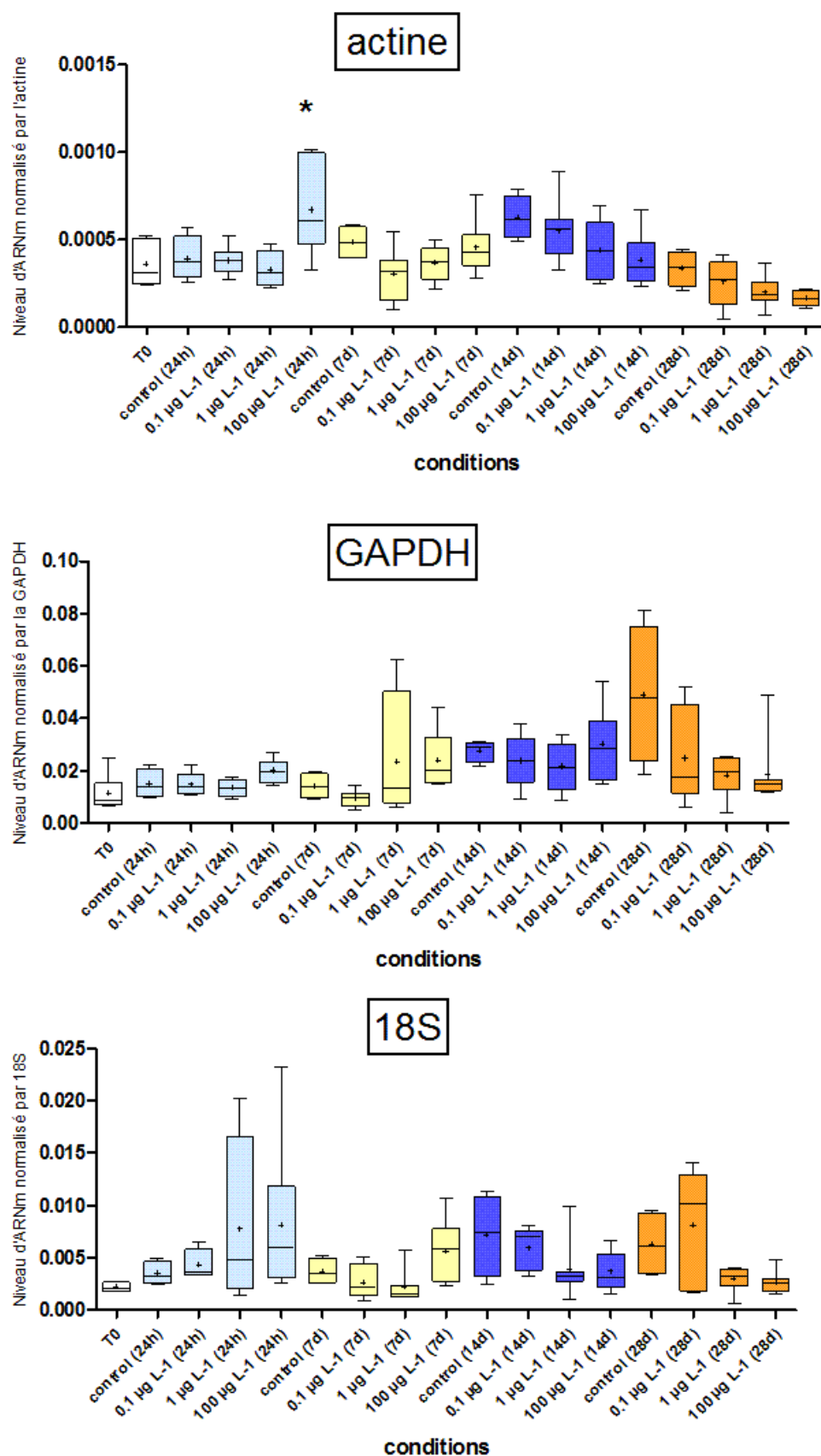


FIGURE B.4 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **CYP450** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).

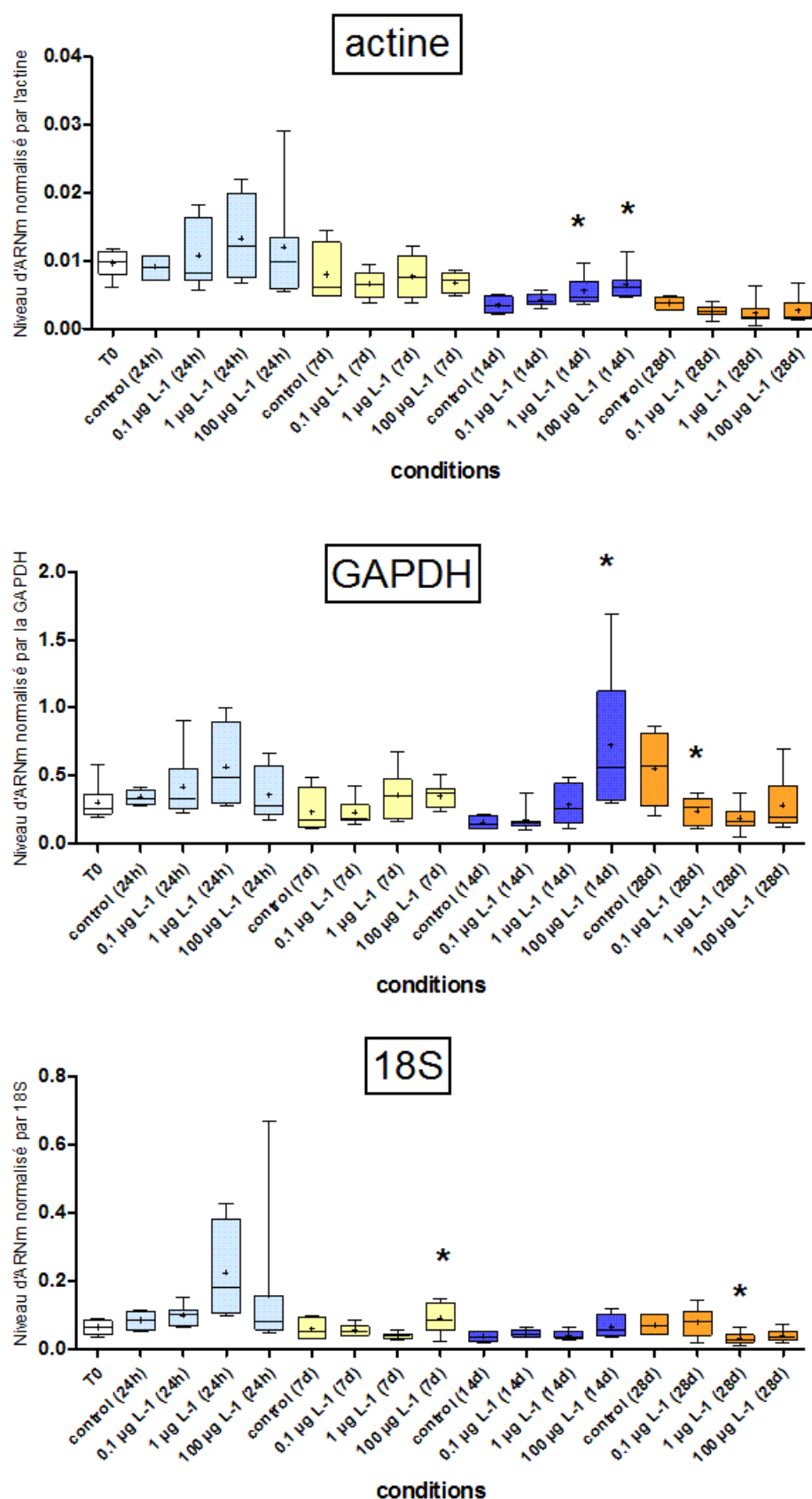


FIGURE B.5 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **P53** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).

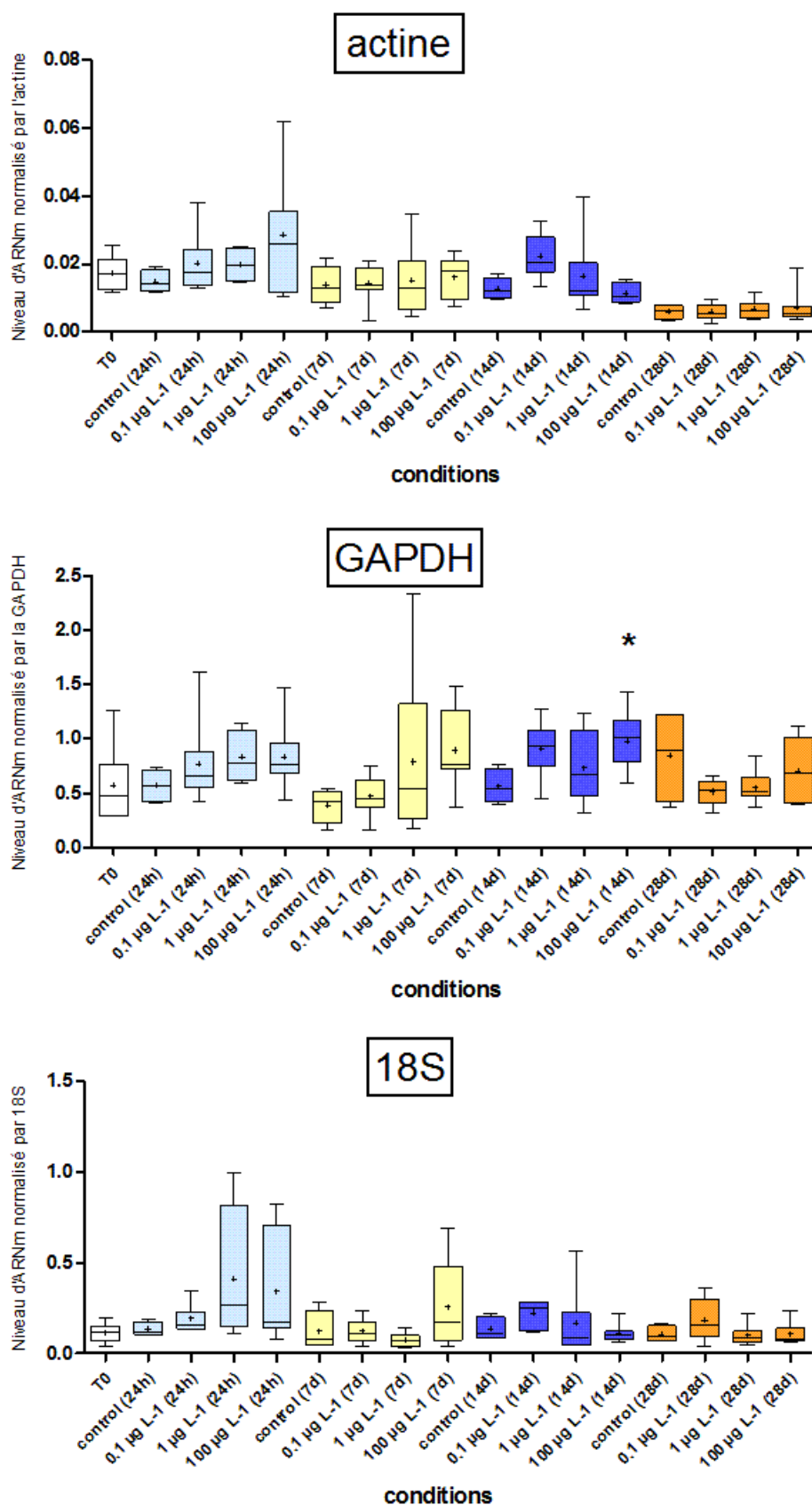


FIGURE B.6 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **SOD** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).

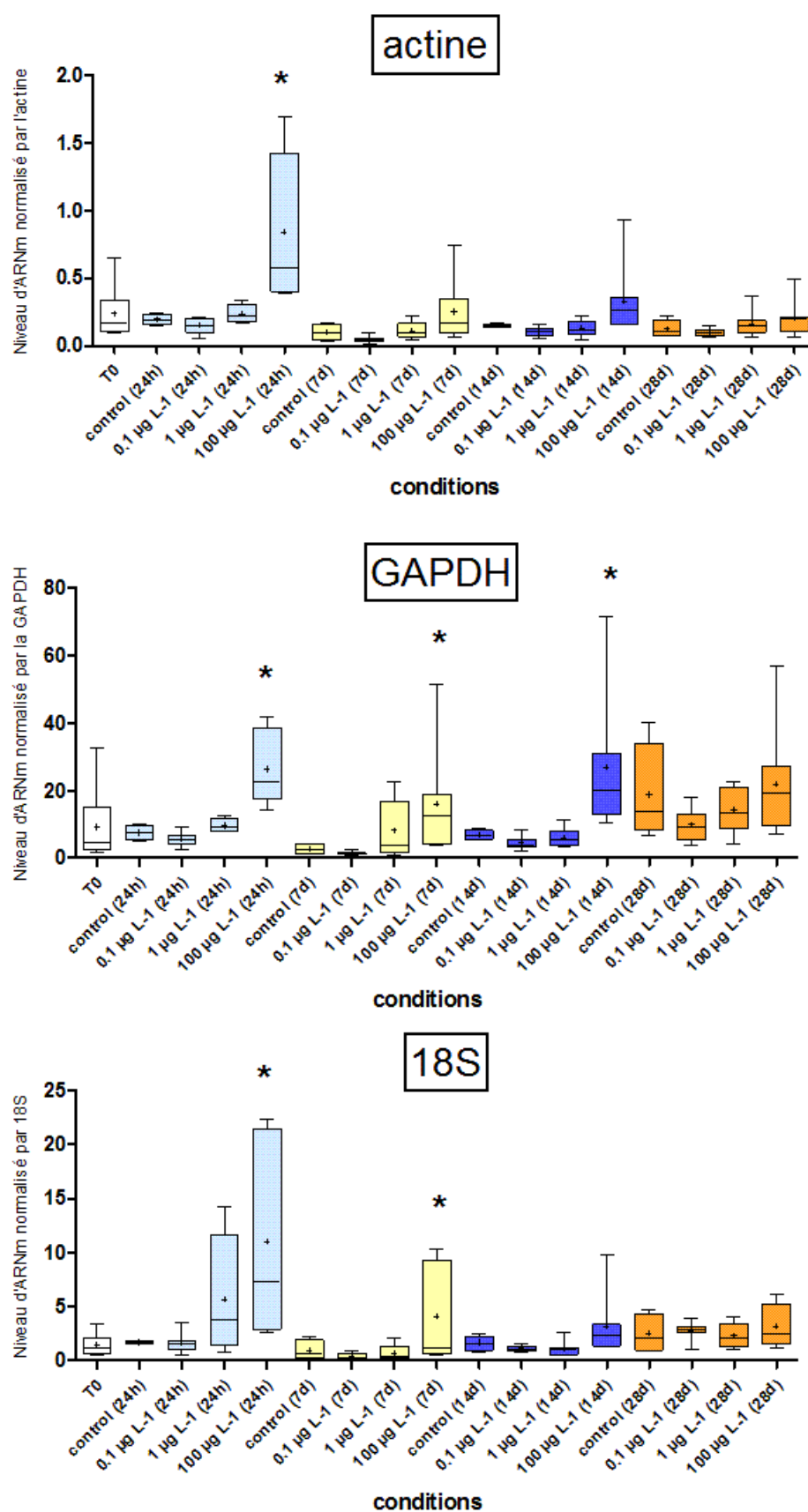


FIGURE B.7 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **MT1 & 2** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).

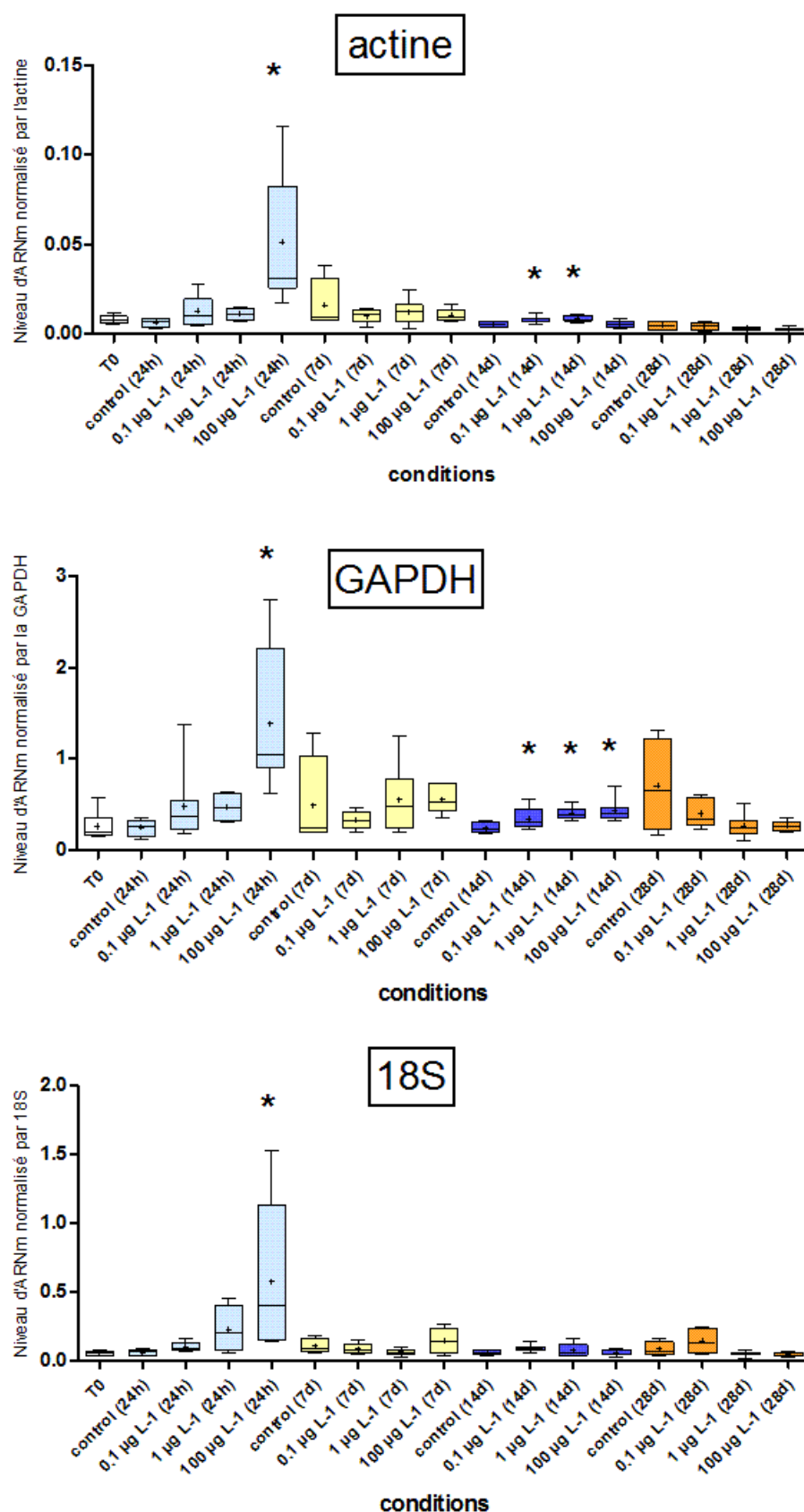


FIGURE B.8 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **GST** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).

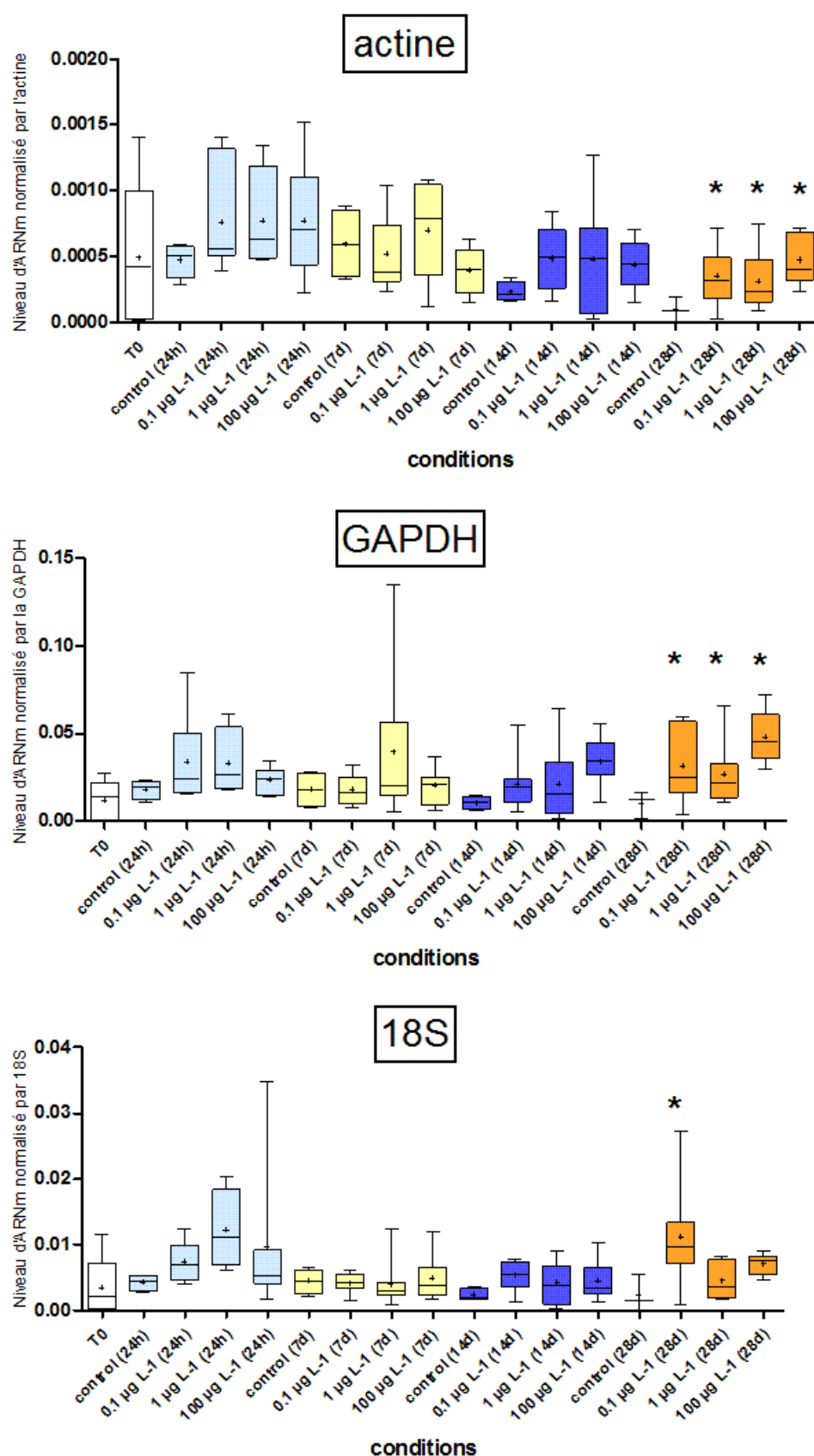


FIGURE B.9 – Niveaux d'expression transcriptionnelle après exposition au glyphosate. **MXR** normalisé par l'actine, la GAPDH et l'ARN 18S. Les données représentées avec le symbole "\*" sont significativement différentes du groupe témoin (ANOVA ou Kruskal & Wallis + tests *post hoc* :  $p < 0.05$ ).



## **Annexe C**

# **Contributions scientifiques**

### **C.1 Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture**





## Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Antoine Mottier<sup>a</sup>, Valérie Kientz-Bouchart<sup>b</sup>, Antoine Serpentin<sup>a</sup>, Jean Marc Lebel<sup>a</sup>,  
Awadhesh N. Jha<sup>c</sup>, Katherine Costil<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS-INEE FRE 3484 BioMEA (Biologie de Mollusques Marins et des Écosystèmes Associés), University of Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France

<sup>b</sup> Departmental Laboratory Franck Duncombe, LDFD, Saint-Contest, 14053 Caen Cedex, France

<sup>c</sup> School of Biomedical and Biological Sciences, Plymouth University, Plymouth PL4 8AA, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 July 2012

Received in revised form

22 November 2012

Accepted 2 December 2012

#### Keywords:

*Crassostrea gigas*

Glyphosate

Roundup®

Embryo-larval development

Metamorphosis

### ABSTRACT

Pesticides may be involved in oyster summer mortality events, not necessarily as a single causative agent but as an additional stressor. In this context, the present study aimed to assess the toxicity of glyphosate, its by-product, aminomethylphosphonic acid (AMPA) and two commercial formulations, Roundup Express® ( $R_{EX}$ ) and Roundup Allées et Terrasses® ( $R_{AT}$ ), containing glyphosate as the active ingredient, on the early life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The embryotoxicity of these chemicals were quantified by considering both the rates of abnormalities and the arrested development or types of abnormalities in D-shaped larvae after 48 h exposure. The success of metamorphosis was examined in pediveliger larvae exposed for 24 h. Experiments involving both endpoints included range finding experiments for herbicide concentrations ranging from 0.1 to 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . This range was then narrowed down in order to determine precise  $\text{EC}_{50}$  values. Actual concentrations of the herbicide were determined at the beginning and after 48 h (embryotoxicity) and 24 h (metamorphosis) to evaluate the potential temporal variation in the concentrations. During embryo-larval development, no mortalities were recorded at any of the concentrations of glyphosate and AMPA, whereas no embryos or D-shaped larvae could be observed after exposure to 10,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of  $R_{EX}$  or  $R_{AT}$ . Compared with the controls, no effects on embryo-larval development were recorded between 0.1 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , regardless of the chemical tested. Above a threshold, which varied according to the chemical used, the gradient of herbicide concentrations correlated with a gradient of severity of abnormality ranging from normal larvae to arrested development (an “old embryo” stage). The  $\text{EC}_{50}$  values were 28,315 and 40,617  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate and its metabolite, respectively, but much lowered values of 1133 and 1675  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $R_{EX}$  and  $R_{AT}$ , respectively. Metamorphosis tests also revealed a significant difference between molecules, as the  $\text{EC}_{50}$  values exceeded 100,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for glyphosate and AMPA but were as low as 6366 and 6060  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the commercial formulations, which appeared relatively more toxic. Overall, the embryo-larval development of *C. gigas* was more sensitive to glyphosate-based herbicides compared to various endpoints studied in regulatory model organisms, and embryos and D-shaped larvae were more sensitive compared to pediveliger larvae.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In Europe, aquatic environments are continuously subjected to various contaminants originating from domestic, industrial and agricultural activities. The English Channel is especially affected by chronic contamination resulting from heavy shipping traffic, industrialisation (including nuclear industry) and high population

density along the coastlines. For example, in the early 1980s, the Seine River, which flows into the English Channel, was considered one of the most contaminated rivers in the world (Carpentier et al., 2002). Today, the situation in the Seine Estuary and the Channel remains worrying with respect to their ecological status and the quality of their marine resources (Cachot et al., 2006; Schnitzler et al., 2011). In addition to recent European legislations, which aim to maintain the high ecological status of the hydrosphere, such considerations have led to the launch of a European Inter-reg IVA program named “Chronexpo”. Under this initiative, the “Chronexpo” project aims to study the effects of chronic exposure

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 31 56 58 28; fax: +33 2 31 56 53 46.

E-mail address: [katherine.costil@unicaen.fr](mailto:katherine.costil@unicaen.fr) (K. Costil).





## Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride

Thomas Latire, Charles Le Pabic, Elmina Mottin, Antoine Mottier, Katherine Costil, Noussithé Koueta, Jean-Marc Lebel, Antoine Serpentine\*

UMR 100 IFREMER «Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins» – IFR 146 ICORE – IBFA – Université de Caen Basse-Normandie, Campus 1, Science C, Esplanade de la Paix, 14032 Caen cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 June 2011

Received in revised form

21 September 2011

Accepted 27 September 2011

#### Keywords:

Haemocytes

Immune parameters

Mollusc

Abalone

*Haliotis tuberculata*

Cadmium chloride

### ABSTRACT

Among metals, cadmium, a non-essential element, is an important pollutant that is released into aquatic environments. Due to its persistence and bioaccumulation, this metal has been shown to exert immunological effects on organisms. The objective of the present study was to investigate the *in vitro* effects of cadmium chloride using a haemocyte primary culture from the European abalone, *Haliotis tuberculata*. Most studies have maintained viable haemocytes *in vitro* for periods ranging from several hours to several days during acute exposures. Few investigations have reported the effects of metals using longer *in vitro* exposures, which are more realistic with regard to mimicking environmental conditions. In this study, we exposed abalone haemocytes to concentrations from 0.5 to 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{CdCl}_2$  for 10 days. The effects of cadmium chloride were reflected in a significant decrease in the number of viable cells and morphological modifications in a concentration-dependent manner beginning at a concentration of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  as well as in some physiological processes, such as phagocytotic activity and the number of lysosome-positive cells. In contrast, phenoloxidase (PO) activity and reactive oxygen species (ROS) production were increased beginning at a concentration of 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , which is consistent with environmental concentrations in polluted sites. For PO activity and ROS production, maximally 9-fold and 130% inductions, respectively, were recorded under the highest dose. These results thus indicate that cadmium chloride alters immune parameters of abalone haemocytes and that the long-term (10 days) primary culture system used here represents a suitable, sensitive *in vitro* model for assessing cytotoxic responses.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

For the past decades, human activities have discharged large quantities of environmental pollutants. Some of the pollutants introduced into terrestrial and aquatic ecosystems may possess important toxic potential. These pollutants are divided into several classes, including polyhalogenated aromatics, hydrocarbons, solvents, pesticides and metals (Galloway and Depledge, 2001).

Among metals, cadmium, a non-essential element, is an important pollutant that is released into the aquatic environment as a result of natural processes as well as human activities. Cadmium has been used for quite some time in industrial processes, such as in active electrode materials in nickel–cadmium batteries, as a stabiliser for polyvinyl chloride against heat and light, as a pigment or to produce corrosion-resistant plating on steel (ATSDR, 1999). This pollutant is present at concentrations ranging from

0.01 to 0.25  $\mu\text{g L}^{-1}$  in open seawater (Chiffolleau et al., 2001; Chora et al., 2009). However, its concentration reaches up to 5–6  $\mu\text{g L}^{-1}$  in coastal and estuarine areas (Crompton, 1997; Ferreira et al., 2004). Cadmium has been shown to exert toxic effects on organisms due to its persistence and bioaccumulation. When present in excess, this metal can have deleterious effects on neurological, reproductive and developmental systems, in addition to immunological effects (ATSDR, 1999). Finally, cadmium is used as model contaminant for *in vivo* and *in vitro* studies.

In molluscs, the cellular immune system is represented by haemocytes, which are responsible for phagocytosis, pathogen hydrolysis, production of reactive oxygen species (ROS) and the phenoloxylase cascade (Galloway and Depledge, 2001; Sahaphong et al., 2001; Hooper et al., 2007; Travers et al., 2008a). Haemocytes are cells that are continually exposed to the external environment due to the open circulatory system of molluscs. In addition, studies have suggested that haemocytes from molluscs are able to sequester metals, including zinc, copper and cadmium (Marigomez et al., 1990; Soto et al., 1996; McIntosh and Robinson, 1999). Numerous studies have shown that cadmium can affect haemocyte

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 31 56 56 80; fax: +33 2 31 56 53 46.

E-mail address: [antoine.serpentine@unicaen.fr](mailto:antoine.serpentine@unicaen.fr) (A. Serpentine).

functions, such as viability (Olabarrieta et al., 2001; Snyman and Odendaal, 2009), phagocytosis (Brousseau et al., 2000; Sauvé et al., 2002), ROS production (Roesijadi et al., 1997; Dailianis, 2009) and apoptosis (Sokolova et al., 2004), as well as proteins involved in cytoskeletal structure maintenance (Gomez-Mendikute and Cajaraville, 2003; Chora et al., 2009). Most of these studies were conducted on bivalve molluscs. However, little is known about the effects of cadmium on the immune system of gastropods, particularly in abalones.

To assess the effects of cadmium chloride on the abalone immune response, an *in vitro* approach was chosen. *In vitro* approaches are alternative experimental methods to whole-animal testing that are employed because of the reduced use of animals, capability for standardisation, low cost and rapid performance associated with these methods, in addition to ethical considerations (Schirmer, 2006; Shuilleabhain et al., 2006). Although *in vitro* assays may not always reflect the true *in vivo* situation, which is more complex, they undoubtedly provide important data to determine mechanisms at the molecular and the cellular levels (Binelli et al., 2009). Indeed, cell cultures have allowed cells to be studied in a controlled environment and in isolation from the multiple physiological systems that regulate their activities *in vivo*. It is for this reason that marine invertebrate cell cultures had been developed during the last decade to study physiological processes (Lebel et al., 1996; Poncet et al., 2000; Serpentine et al., 2000; Riinkevich, 2005; Auzoux-Bordenave and Domart-Coulon, 2010), including the effects of pollutants (Domart-Coulon et al., 2000; Le Pennec and Le Pennec, 2001).

In an ecotoxicological study, Fent (2001) demonstrated that an *in vitro* cell culture system for fish was very useful, sensitive and selective for the detection, evaluation and monitoring of anthropogenic contaminants in aquatic environments. Similarly, marine invertebrate cells, especially haemocytes, are routinely used for specific endpoints with great precision and reproducibility (Brousseau et al., 2000; Olabarrieta et al., 2001; Gagnaire et al., 2004; Duchemin et al., 2008; Mottin et al., 2010). However, these previous studies have only maintained viable haemocytes in primary culture for periods ranging from a few hours to 1 or 2 days during acute exposures, which require the use of large amounts of contaminant. Few investigations have reported the effects of metals using longer *in vitro* exposures that are more realistic to mimic environmental conditions. The objective of the present study was to investigate the *in vitro* effects of cadmium chloride using haemocyte primary culture from the European abalone, *Haliotis tuberculata*. Recently, Travers et al. (2008a) have demonstrated that haemocytes of *H. tuberculata* are mainly composed of hyalinocytes, although some rare basophilic granulocytes could be observed with Giemsa staining. Our culture system contains all the haemocyte types present in this gastropod. Cells were exposed to cadmium chloride for 10 days and, immune parameters were analysed using morphological, biochemical and flow cytometry approaches.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Specimens

Adult abalone of the species *H. tuberculata* 9–11 cm in shell length were collected by Ormasub® from natural populations on the northern Cotentin peninsula (France). The animals were maintained in natural and continuously aerated seawater at 17 °C and regularly fed with a mixed algal diet (*Laminaria* sp. and *Palmaria* sp.) at the Centre de Recherche en Environnement Côtier (C.R.E.C., Luc-sur-Mer, Basse-Normandie, France). The abalones were acclimated for at least 2 weeks before the experiments began.

### 2.2. Primary cell cultures

Haemocytes were cultured as previously described (Lebel et al., 1996; Serpentine et al., 2000; Mottin et al., 2010). Briefly, after making a medio-lateral incision in the abalone foot, haemolymph was collected (10–15 mL per animal) with a 20 mL syringe fitted with a 25-gauge hypodermic needle. Haemolymph was transferred to a sterile tube and diluted 1:4 in cooled sterile anticoagulant modified Alsever's solution (115 mM glucose; 27 mM sodium citrate; 11.5 mM EDTA; 382 mM NaCl) (Bachère et al., 1988). Haemocytes were rapidly plated at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells per well in 6-well plates (MTT assay or enzymatic analysis) or  $0.5 \times 10^6$  cells per well in 12-well plates (flow cytometry analysis), into which three volumes of sterile artificial seawater were added. The cultures were maintained at 17 °C in a CO<sub>2</sub>-free incubator. After 90 min of incubation, the cells were covered with Hank's sterile 199 medium modified by the addition of 250 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 10 mM Hepes (final pH of 7.4). The medium was supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 60 µg mL<sup>-1</sup> penicillin G and 2 mM concanavalin A. The cells were then maintained at 17 °C for 24 h before beginning the experiments.

### 2.3. Cadmium chloride exposure

The medium was replaced, and cells were exposed to the following range of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) concentrations: 0.5, 5, 50, 500, 5000 and 50,000 µg L<sup>-1</sup>. Cadmium concentrations up to 5 µg L<sup>-1</sup> correspond to environmental concentrations reported in coastal water (Crompton, 1997; Chiffolleau et al., 2001; Ferreira et al., 2004). Then tested concentrations were increased by a 10-fold up to 50,000 µg L<sup>-1</sup>. For each concentration, the treatment was performed in triplicate. The medium was changed every day, and the cultures were maintained for 10 days. Each culture was repeated twice.

### 2.4. MTT assay

Cellular viability was estimated using a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay, which is a sensitive and quantitative colorimetric assay that measures the capacity of mitochondrial succinyl dehydrogenase in living cells to convert a yellow substrate (MTT) into a dark blue formazan product (Mosmann, 1983). This test was adapted to molluscan cell cultures by Domart-Coulon et al. (1994). Briefly, 10% (v/v) of the MTT stock solution (5 mg MTT/mL of PBS) was added to the culture dishes. After 24 h of incubation, an equal volume of isopropanol containing 0.04 N HCl was added to each culture to dissolve the converted formazan. The absorbance was then measured at a wavelength of 570 nm with a 630 nm reference. LC<sub>50</sub> (10 days) was used as an index of cytotoxicity.

### 2.5. Morphometric analysis

The potential effects of cadmium chloride on cell morphology were tested by culturing haemocytes as described above on coverslips. Cells were fixed in methanol for 10 min at room temperature, and the nuclei and cytoplasm were stained with hematoxylin and light green dye, respectively. The haemocytes were then incubated for 10 min in acetone, and the coverslips were mounted in Roti-Histol® (Roth, Karlsruhe, Germany). Observations were carried out using a Nikon Eclipse 80i light microscope. The cell and nuclear areas were measured for 100 haemocytes using a computer-assisted microscopic image analysis system, NIS-elements D 2.30 software (Nikon®, Champigny-sur-Marne).

## 2.6. Enzyme activities

### 2.6.1. Phenoloxidase activity

Phenoloxidase activity was determined in the haemocyte culture medium by measuring the transformation of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) to dopachrome (Hernandez-lopez et al., 2003). Briefly, 250  $\mu$ L of Tris (10 mM)/NaCl (150 mM) buffer, pH 8, 250  $\mu$ L of cacodylate buffer (10 mM) and 250  $\mu$ L of L-DOPA (3 mg.mL<sup>-1</sup>) were added to a 250  $\mu$ L sample. After 1 h of incubation at 25 °C, the absorbance was measured at 492 nm. Phenoloxidase activity was expressed as an arbitrary unit. The amount of protein in each sample was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (0–25  $\mu$ g) as a standard.

## 2.7. Flow cytometry analysis of abalone haemocytes

Haemocyte analysis was performed using an EPICS XL 4 flow cytometer (Beckman Coulter®), and 20,000 events were counted for each sample. The results were expressed as cell cytograms, indicating the size (FSC value), the complexity (SSC value) and the level of fluorescence using the FL1 channel as described previously (Mottin et al., 2010).

### 2.7.1. Phagocytic activity

For phagocytic assays, 7  $\mu$ L of bead solution (carboxylate-modified FluoroSpheres®, yellow-green fluorescence, 1  $\mu$ m diameter, Molecular Probes) was added to each well. Cells were incubated for 60 min at 17 °C in the dark. Phagocytosis was measured as the proportion of cells that gave a fluorescent signal equal to or greater than the fluorescence of three beads, as previously described (Sauvé et al., 2002; Hégaret et al., 2003; Auffret et al., 2006).

### 2.7.2. Lysosome presence

The presence of lysosomes was measured using a commercial kit (LysoTracker® Green DND-26, Molecular Probes) (Gagnaire et al., 2006). This probe consists of a fluorophore linked to a weak base that is partially protonated at neutral pH. LysoTracker® is freely permeant to cell membranes and typically concentrated in lysosomes. LysoTracker® was added to each well at a final concentration of 10  $\mu$ M, and cells were then incubated for 60 min at 17 °C in the dark. The results were expressed as the percentage of cells exhibiting fluorescence.

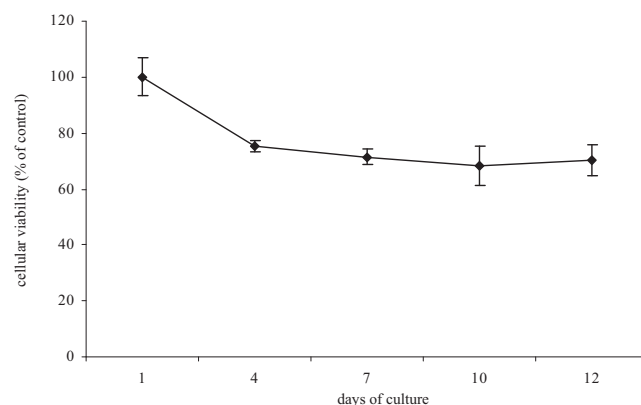
### 2.7.3. Reactive oxygen species (ROS) production

ROS production was evaluated using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, sigma) method (Bass et al., 1983), as adapted to mollusc cells by Lambert et al. (2003). Haemocytes were incubated for 20 min at 17 °C in the dark with DCFH-DA to a final concentration of 100  $\mu$ M. Then, 6  $\mu$ L of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 mg/mL, Sigma) was added to each well, and the cells were incubated for 60 min at 17 °C in the dark. The results were expressed as the percentage of cells exhibiting fluorescence.

Following the incubation, the wells were scraped gently, and the samples were centrifuged at 500  $\times$  g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was mixed with 300  $\mu$ L of 3% paraformaldehyde (PFA). After incubation for 20 min at 25 °C, 200  $\mu$ L of PBS was added to each sample. Samples were stored at 4 °C until analysis.

## 2.8. Data analysis

Results are expressed as means  $\pm$  S.D. Each experiment was repeated at least three times, and the means were calculated from triplicates for each experiment. The significance of the differences between mean values was estimated using Student's *t*-tests



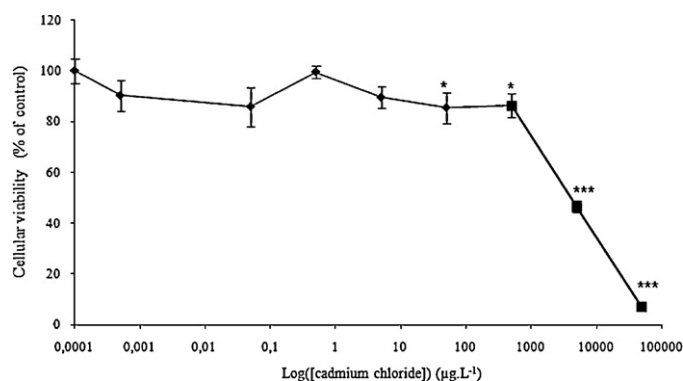
**Fig. 1.** MTT reduction assay in *Haliotis tuberculata* haemocytes after 12 days of culture. Haemocytes were plated at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells per well in 6-well culture plates and cultured at 17 °C in modified Hank's-199 medium. The medium was replaced 24 h after the initiation of the cultures. Each data point represents the mean percentage  $\pm$  standard deviation of triplicate cultures.

## 3. Results

### 3.1. Effects of cadmium chloride on haemocyte viability

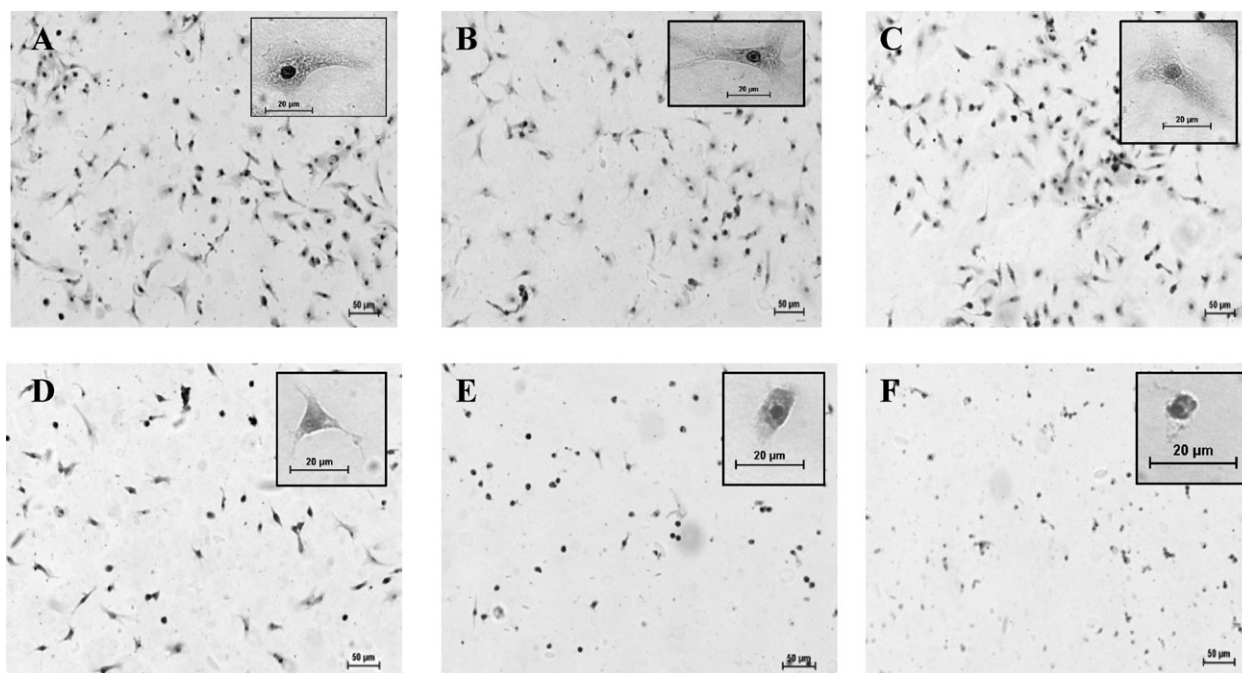
To assess our *in vitro* assay in experiments carried out for a longer than 24-h exposure, which is the classically used period for such experiments, we studied the time-course effect on haemocyte viability. As shown in Fig. 1, after a slight increase (day 1) due to initiation of the culture, haemocyte viability was stable between days 4 and 12. To avoid reaching sub-lethal haemocyte metabolism, we choose to perform experiments on *H. tuberculata* haemocytes after 10 days of culture.

In this study, abalone haemocytes were exposed to various concentrations of cadmium chloride (0.5–50,000  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) for 10 days to assess the toxicity of this metal. The obtained dose-response cytotoxicity curve, as quantitated by an MTT assay, is presented in Fig. 2. No difference from the control was found for cadmium chloride concentrations lower than 50  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Haemocyte viability decreased very significantly in a concentration-dependent manner beginning at a cadmium chloride concentration of 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. The LC<sub>50</sub> (10 days), represents the cadmium chloride concentration required to reduce cell viability to 50%, was 4100  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, as determined from semilogarithmic plots.



**Fig. 2.** Concentration–response effect of cadmium chloride on haemocyte viability as determined by the MTT reduction assay. Cells were exposed to CdCl<sub>2</sub> for 10 days. Each data point represents the mean percentage  $\pm$  standard deviation of triplicate cultures. Significant differences from control cells at \**p* < 0.05 and \*\*\**p* < 0.001 are given.





**Fig. 3.** Light microscopy images showing the morphology of *Haliotis tuberculata* haemocytes. Cells were seeded on coverslips at a density of  $0.5 \times 10^6$  cells per well and grown at 17 °C in culture medium for 10 days in the absence (A) or presence of a range of cadmium chloride concentrations: 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (B), 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (C), 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  (D), 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (E), 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (F). Top panel: magnification of typical haemocytes.

### 3.2. Effects of cadmium chloride on haemocyte morphological parameters

Light microscopy showed that haemocyte morphology changed in response to cadmium chloride treatment. Cells cultured for 10 days in the absence of cadmium chloride presented an elongated shape with large pseudopods and were mostly interconnected (Fig. 3A). No morphological changes were observed at concentrations of 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride (Fig. 3B and C). Beginning at 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride, haemocytes became more rounded and a reduction of contact with neighbouring cells was observed. This loss of cell-to-cell contact was particularly evident at 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 3E and F). These observations were quantified using image analysis. The percentage of rounded cells increased significantly in a concentration-dependent manner compared to the control beginning at a concentration of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride. We measured 2-fold, 6-fold and 7.5-fold increase in the proportion of rounded cells associated with exposures of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively (Table 1). Additionally, the mean haemocyte area decreased significantly in a concentration-dependent manner. Compared to the control ( $323.6 \pm 14.1 \mu\text{m}^2$ ), cell area reductions of 38.7%, 70.8% and 83.5% were calculated in the presence of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride, respectively (Table 1). Simultaneously, the nucleocytoplasmic ratio increased significantly, by 30.8%, 34.6% and 64.5% in the presence of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,

5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride, respectively (Table 1).

### 3.3. Effects of cadmium chloride on phenoloxidase activity

Phenoloxidase (PO) activity was analysed after a 10-day exposure of abalone haemocytes to cadmium chloride in culture. PO activity significantly increased from 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  compared to the control, and the fold induction ranged from 2.6-fold at 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride to 9-fold at 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 4).

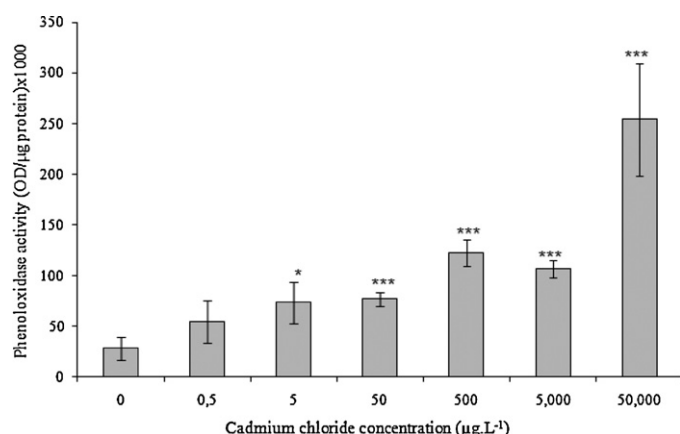
### 3.4. Effects of cadmium chloride on immune parameters

The effects of cadmium chloride on various cellular activities were assessed by flow cytometry after 10 days of exposure to the metal (Fig. 5). Under our experimental conditions, the percentage of haemocytes that engulfed three beads or more was  $31.3 \pm 7.7\%$  for the control. The phagocytic activity was significantly inhibited when cells were exposed to concentrations of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride. The highest concentration (50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) decreased phagocytic activity by 27.55% compared to the 100% control (Fig. 5A). Lysosome content was significantly ( $p < 0.01$ ) decreased by 29.3% compared to the 100% control when cells were exposed to 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cadmium chloride ( $27.32 \pm 2.7\%$  vs  $38.50 \pm 3.2\%$  for the control) (Fig. 5B). In contrast, the results showed a concentration-dependent increase of ROS production in cells exposed to concentrations of 5  $\mu\text{g L}^{-1}$

**Table 1**  
Effects of cadmium chloride on haemocyte morphological parameters. The cell and nuclear areas were measured in 100 haemocytes. Each data point represents the mean percentage  $\pm$  standard deviation of triplicate cultures. Significant differences from control cells at \*\*\* $p < 0.001$  are indicated.

Concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	5	50	500	5000	50,000
% Rounded cells	$12.67 \pm 2.29$	$12.90 \pm 1.40$	$9.93 \pm 3.32$	$24.93 \pm 6.25$	$75.85 \pm 9.43$	$95.99 \pm 1.26$
Significativity				***	***	***
Cell area ( $\mu\text{m}^2$ )	$323.60 \pm 14.07$	$308.37 \pm 14.87$	$323.05 \pm 14.52$	$198.24 \pm 11.22$	$94.41 \pm 4.15$	$53.28 \pm 2.05$
Significativity				***	***	***
Nucleo-cytoplasmic ratio	$0.107 \pm 0.0049$	$0.101 \pm 0.0047$	$0.103 \pm 0.0037$	$0.140 \pm 0.0052$	$0.144 \pm 0.0056$	$0.176 \pm 0.0066$
Significativity				***	***	***





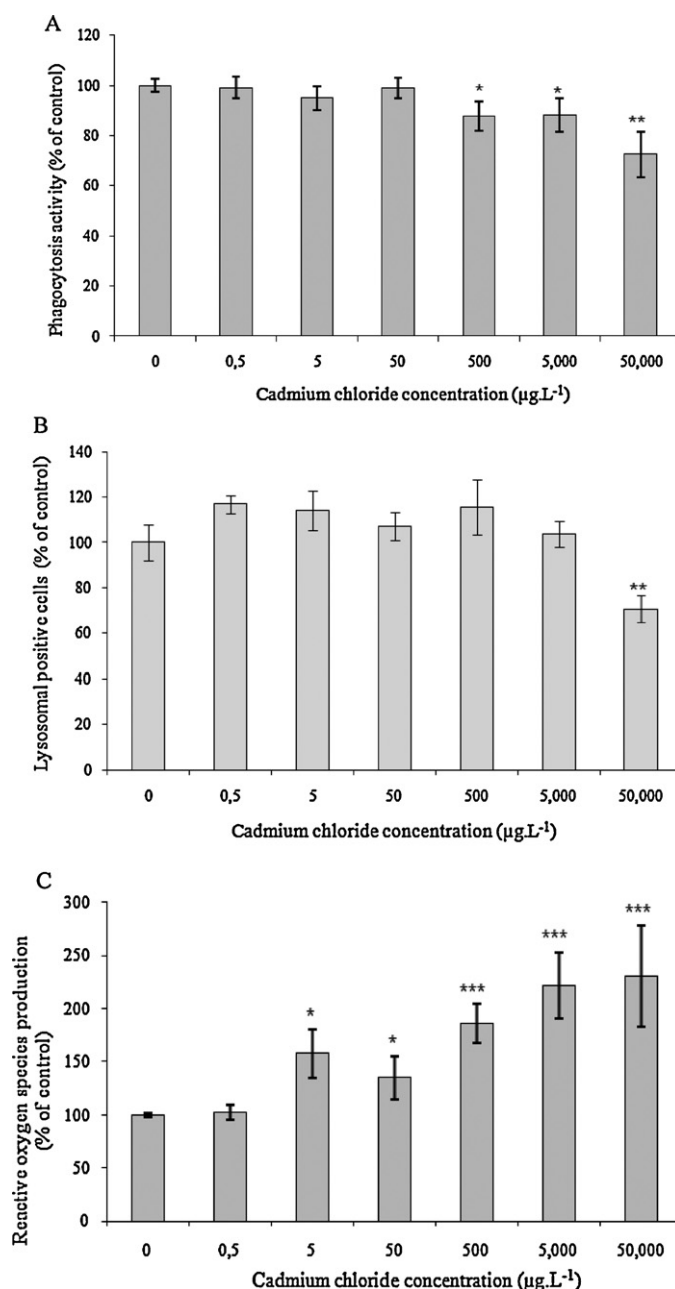
**Fig. 4.** Effects of cadmium chloride on haemocyte phenoloxidase activity after 10 days of exposure. Each data point represents the mean percentage  $\pm$  standard deviation of triplicate cultures. Significant differences from control cells at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  are given.

of cadmium chloride and above. A maximal significant ( $p < 0.001$ ) increase of ROS production of 130.6% for the highest cadmium chloride concentration ( $29.33 \pm 7.6\%$  vs  $12.07 \pm 0.8\%$  for the control) was observed (Fig. 5C).

#### 4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the *in vitro* effects of cadmium chloride using haemocyte primary cultures from the European abalone, *H. tuberculata*. To avoid acute exposures, we chose to expose cells to the contaminant for 10 days using doses that mimic environmental conditions as much as possible. Our results showed that abalone haemocytes adapted well to *in vitro* culture. Under our experimental conditions, haemocytes could be cultured without any marked decrease in viability for at least 12 days. Cells remained attached to the culture dishes, presenting two distinctive adherent morphological types under light microscopy: spreading cells with large interconnected pseudopods and a few rounded cells. Similar morphological findings have been observed in different studies on abalone haemocytes, and this indicates the good metabolic status of our cells (Lebel et al., 1996; Travers et al., 2008a; Mottin et al., 2010; Van der Merwe et al., 2010). Moreover, Van der Merwe et al. (2010) showed that haemocytes from *Halio-tis midae* could be maintained *in vitro* with constant viability for 7 days, while haemocytes from *H. tuberculata* could be maintained for 9 days. Our results appear to be in accordance with previous reports indicating that haemocytes cultured *in vitro* for 10 days could be a useful tool for assessment of the cytotoxicity of environmental contaminants.

Thus, we analysed the *in vitro* effects of cadmium chloride using a multi-parametric approach. First, the results showed that cadmium chloride decreased cell viability in a concentration-dependent manner beginning at a concentration of  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$  compared to the control. The maximum toxicity was observed when cells were exposed to  $50,000 \mu\text{g.L}^{-1}$  of cadmium chloride (93% of cells died at this concentration). Several studies have reported a decrease of haemocyte viability in response to *in vitro* exposure to cadmium (Brousseau et al., 2000; Olabarrieta et al., 2001; Gomez-Mendikute and Cajaraville, 2003). For example, concentration-dependent increases of mortality were observed for haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* after 24 h of exposure to  $10 \mu\text{M}$  ( $1833 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) to  $2000 \mu\text{M}$  ( $366,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ )  $\text{CdCl}_2$  and for haemocytes from *Mya arenaria* after 18 h of exposure to  $100 \mu\text{M}$  ( $18,332 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) to  $1000 \mu\text{M}$  ( $183,320 \mu\text{g.L}^{-1}$ )  $\text{CdCl}_2$ . In our study, the  $\text{LC}_{50}$  value (representing the cadmium chloride concentration



**Fig. 5.** Effects of cadmium chloride on immune parameters after a 24-h incubation. Relative phagocytic activity (A), lysosome-positive cells (B) and ROS production (C) compared to the 100% control. Each data point represents the mean percentage  $\pm$  standard deviation of triplicate cultures. Significant differences from control cells at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  are given.

at which 50% of cells died after 10 days of exposure) was calculated to be  $4100 \mu\text{g.L}^{-1}$ . To our knowledge, this is the first time that a  $\text{LC}_{50}$  was calculated for molluscan haemocytes *in vitro* after a 10-day exposure to  $\text{CdCl}_2$ . Olabarrieta et al. (2001) reported an  $\text{LC}_{50}$  of approximately  $400 \mu\text{M}$  ( $73,328 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) in an XTT assay for *M. galloprovincialis* haemocytes exposed for only 24 h to  $\text{CdCl}_2$ . For haemocytes from *M. arenaria*, an  $\text{LC}_{50}$  of approximately  $1000 \mu\text{M}$  ( $183,320 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) was determined by PI fluorescence after an 18 h exposure to  $\text{CdCl}_2$  (Brousseau et al., 2000). Thus, our results appear to be in agreement with previous reports concerning the toxicity of cadmium, but our primary culture system appears to be a more sensitive *in vitro* model to assess environmental pollutants based on the fact that our  $\text{LC}_{50}$  value was approximately 20–40 times lower than that found in previous studies. The mortality observed

in the cultured abalone cells could be explained by programmed cell death of these haemocytes because  $\text{Cd}^{2+}$  is known to induce apoptosis in vertebrate immune cells, and Sokolova et al. (2004) have demonstrated that a 72-h cadmium exposure induces apoptosis in haemocytes of the oyster *C. virginica* in a concentration-dependent manner in the range of 10–100  $\mu\text{M}$ . Further studies should be conducted to confirm this hypothesis in *H. tuberculata* haemocytes exposed to cadmium chloride.

Second, haemocyte pseudopods and the capacity for attachment play important roles in cellular migration and immune defence in molluscs. The results obtained in this study demonstrate that haemocyte morphology was modified by treatment with cadmium chloride (from a concentration of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Decreases in the spreading of haemocytes and cell areas were observed, while increases in the percentage of rounded cells and the nucleocytoplasmic ratio were found. Olabarrieta et al. (2001) and Gomez-Mendikute and Cajaraville (2003) observed that haemocytes from *M. galloprovincialis* adopt a round shape with no extensions when cells in primary culture are exposed to increased concentrations of  $\text{CdCl}_2$  of 100  $\mu\text{M}$  (18,332  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and greater. These morphological modifications due to a metal treatment are generally associated with a disturbance of cytoskeleton organisation, as demonstrated by fluorescence microscopy (Chou, 1989; Fagotti et al., 1996; Olabarrieta et al., 2001; Gomez-Mendikute and Cajaraville, 2003) or proteomic analysis (Chora et al., 2009).

In this study, a battery of biomarkers was investigated using spectrophotometry and flow cytometry analyses to characterise the effects of cadmium chloride on haemocytes of *H. tuberculata*. Our results demonstrate that phagocytosis activity and the percentage of lysosome-positive cells were reduced (maximum of approximately 30% compared to the control) in the presence of cadmium chloride beginning at concentrations of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. In contrast, phenoloxidase (PO) activity and ROS production were significantly increased in a concentration-dependent manner beginning at a concentration of 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Maximum inductions of 9-fold and 130% were recorded under the highest dose of cadmium chloride tested for PO activity and ROS production, respectively.

In molluscs, PO is an important humoral defence system that catalyses reactions converting L-DOPA and dopamine to bactericide molecules. Numerous studies have reported measurements of PO activity from haemocytes of many mollusc species (Coles and Pipe, 1994; Asokan et al., 1997; Lopez et al., 1997; Luna-Gonzales et al., 2003; Hellio et al., 2007), especially abalones (Cheng et al., 2004a,b,c,d; Travers et al., 2008b; Gopalakrishnan et al., 2009; Mottin et al., 2010; Zhou et al., 2010). In the present study, we showed that cadmium chloride greatly increased PO activity. Similar increases of PO activity have been observed in abalones exposed to abiotic or xenobiotic factors (Cheng et al., 2004d; Gopalakrishnan et al., 2009). For example, Gopalakrishnan et al. (2009) demonstrated that PO activity in the haemolymph of *Haliotis diversicolor* was significantly stimulated by a 7-day exposure to 40 or 80  $\mu\text{g L}^{-1}$  of benzo(a)pyrene. Using a primary cell culture approach, Mottin et al. (2010) recently showed an increase in PO activity in a concentration-dependent manner when haemocytes from *H. tuberculata* were exposed to zinc for 24 h *in vitro*. Moreover, some studies conducted on bivalves have also described increases in PO activity in response to pollutant exposure *in vivo* (Coles et al., 1994) or *in vitro* (Bado-Nilles et al., 2008), including for cadmium (Bouilly et al., 2006). Thus, our results are in agreement with those presented in the literature. In contrast, a decrease of PO activity has been reported in studies performed on *Haliotis diversicolor supersexta* exposed to variations in abiotic factors, such as temperature, salinity or ammonia (Cheng et al., 2004a,b,c), and in *Crassostrea gigas* haemocytes exposed for 21 h to mercury (Gagnaire

et al., 2004). Therefore, the PO activity response to contaminants appears to vary according to the species and contaminant studied.

Phagocytosis is the first line of cellular defence in molluscs, and measurement of phagocytosis represents a sensitive endpoint to evaluate the adverse effects of metals (Sauvé et al., 2002). In the present study, phagocytosis decreased under concentrations of cadmium chloride from 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . This result was in agreement with findings of other studies that have reported an inhibition of phagocytic activity when mollusc haemocytes are exposed to different metallic contaminants (Brousseau et al., 2000; Auffret et al., 2002; Sauvé et al., 2002; Duchemin et al., 2008; Mottin et al., 2010). For example, using flow cytometry, Sauvé et al. (2002) have shown that metals, including cadmium, have a high immunosuppressive potential from concentrations of  $10^{-4}$  M (18,332  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in several marine and freshwater bivalves. A reduction of phagocytic activity is generally associated with cell cytoskeleton disorganisation, leading to cell shape changes and a decreased ability of haemocytes to adhere to the substrate and to interact with foreign particles (Fagotti et al., 1996; Cima et al., 1999; Matozzo et al., 2001). Matozzo et al. (2001) suggested that these alterations could be mediated directly by the interaction of metals with structural proteins of the cytoskeleton or indirectly by dysfunctions in calcium homeostasis mechanisms. Further studies should be conducted to evaluate whether the decrease of phagocytotic activity, related to an increase in the proportion of rounded cells, is a direct or indirect effect of cadmium chloride on abalone haemocytes.

In this study, analysis of lysosome-positive cells allowed us to demonstrate a significant effect of cadmium chloride. Lysosomes are important elements of the immune system because they play a crucial role during phagocytosis. Moreover, these organelles secrete hydrolytic enzymes involved in the degradation of foreign particles. The information provided by the fluorescent probe used in this study is complex, and this probe only marks lysosomes presenting an intact membrane. It does not give information about the size of the lysosomes inside the cells but information about both the number of lysosomes present in the cell (the greater the number of lysosomes present, the more the intensity of fluorescence increases) and the integrity of their membranes. This commercial probe was used to detect lysosomal content in studies on human cells as well as molluscan haemocytes (Via et al., 1998; Mateo et al., 2009). Few studies have investigated the effects of heavy metals on lysosomes using the flow cytometry method. Gagnaire et al. (2006) obtained similar results using LysoTracker® as probe. These authors observed a decrease in the number of lysosome-positive haemocytes from *C. gigas* exposed *in vitro* to various contaminants, including HAP (benzo(a)pyrene, phenanthrene, anthracene), PCB and paraoxon (insecticide). Using neutral red assay, Marchi et al. (2004) and Matozzo et al. (2001) reported increased destabilisation of the lysosomal membrane of haemocytes from bivalve molluscs exposed to mercury or cadmium. A loss of lysosome integrity was also observed in haemocytes from *M. edulis* and *H. diversicolor* cultured in an environment enriched in HAP (Grundy et al., 1996; Gopalakrishnan et al., 2009). However, these results are contradictory to those from studies showing increased fluorescence intensity using the probe LysoTracker® in haemocytes from *C. gigas* exposed *in vitro* to Dibenz[a,h]anthracene (Bado-Nilles et al., 2008), or *in vivo* to diuron (Bouilly et al., 2007). Moreover, Coles et al. (1995) showed a significant increase in the uptake of neutral red of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis* exposed for 7 days to cadmium, indicating that lysosome alterations appear to vary according to the species and contaminant studied. In addition, lysosomes have been reported to be a valid marker of cell viability (Moore et al., 1994; Lowe and Pipe, 1994; Lowe et al., 1995; Lowe and Fossato, 2000). In our study, the observed decrease of lysosome-positive cells could

be related to a drastic increase in cell mortality. Thus, our results are in accordance with those presented in the literature.

Our results regarding ROS production indicated that cadmium chloride induced ROS production in abalone haemocytes in a concentration-dependent manner from a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Several authors have reported an increase of ROS production by different cell types in response to metal exposure (Song et al., 2004; Kaloyianni et al., 2006; Koutsogiannaki et al., 2006). Koutsogiannaki et al. (2006) demonstrated that micromolar concentrations of cadmium ( $50 \mu\text{M}$ ) induce a significant increase in the  $\text{O}_2^-$  concentration in isolated gill cells of *M. galloprovincialis*. Cadmium is known to increase ROS production (e.g., superoxide, singlet oxygen, hydrogen peroxide reactive hydroxyl radical) and to disturb the efficiency of the anti-oxidant system (Stohs and Bagchi, 1995; Koutsogiannaki et al., 2006; Nzengue et al., 2008). Based on experiments using the human keratinocyte HaCaT cell line, Nzengue et al. (2008), proposed that cadmium-induced oxidative stress could result from a combination of two mechanisms: cadmium acts directly on the mitochondrial respiratory chain, generating overproduction of ROS, or cadmium is able to interact directly with glutathione peroxidase and catalase, decreasing their efficiency in detoxifying peroxides and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , with both of these processes leading to an increase in ROS level. Further investigations including measurement of enzymatic activities (e.g., catalase, GST) should be conducted to evaluate the mechanistic process of ROS overproduction in abalone haemocytes.

It has been demonstrated that ROS overproduction can directly affect cytoskeletal proteins by changing the redox state of some actin regulatory proteins, by altering the redox state of actin itself or by changing the structure of actin monomers (Dalle-Donne et al., 2001; Milzani et al., 2001; Gomez-Mendikute and Cajaraville, 2003), and all of these modifications lead to denaturing of cytoskeleton. In the present study, the observed ROS overproduction was associated with an increase in the proportion of rounded cells, suggesting an alteration of the cytoskeleton. Thus, our results were in accordance with those presented in the literature. In addition, it cannot be excluded that this contaminant induced apoptosis when haemocytes were exposed to higher cadmium concentration. Indeed cadmium is known to induce apoptosis and necrosis in both vertebrates and invertebrates. For example, Sokolova et al. (2004) have shown that cadmium exposure induced apoptosis in *C. gigas* haemocytes in a concentration-dependent manner. The maximum induction was reached at  $100\text{--}200 \mu\text{M}$  ( $18,332\text{--}36,600 \mu\text{g L}^{-1}$ ) after 72 h of exposure. These authors reported that higher concentrations of cadmium failed to further increase apoptosis but resulted in elevated necrosis. In our study, abalone haemocytes were exposed up to  $50,000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $272 \mu\text{M}$ ) cadmium concentration. The drastic effects observed at this concentration could also be a consequence of apoptosis. Further investigation should be conducted to analyse apoptosis process in abalone haemocytes exposed to cadmium.

## 5. Conclusion

In the present study, *in vitro* experiments showed that cadmium chloride contamination could affect *H. tuberculata* haemocyte parameters. A 10-day exposure decreased cell viability and induced morphological alteration of haemocytes. Furthermore, this contamination significantly decreased phagocytotic activity and the number of lysosome-positive cells ( $500\text{--}50,000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), whereas PO activity and ROS production were significantly increased in a concentration-dependent manner from concentrations of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . We can speculate that in our *in vitro* system, cadmium chloride induced ROS overproduction, which could have directly altered cytoskeletal proteins. As a consequence, the phagocytic activity

of *H. tuberculata* haemocytes was decreased. This hypothesis is in accordance with studies indicating that phagocytosis is an actin-dependent process (Grenfeldt and Dahlgren, 2001; May and Machesky, 2001).

In addition, the present study showed the importance of using *in vitro* cell models to understand the action of environmental contaminants. Even if all the biomarkers analysed were not modified at low cadmium chloride concentrations, we observed an increase in PO activity and ROS production at levels similar to those recorded in the environment ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). On the other hand, with regard to the cell viability, cell morphology, phagocytotic activity and lysosome content, the effects were observed at concentrations higher than those encountered in the environment. However, exposure in our experiment lasted only 10 days while in natural conditions the cells are in contact with contaminants for a longer period. In comparison with acute exposures, such experiments reflect more physiological responses of haemocytes and are especially suitable to analyse mechanistic processes. Thus, this study shows that our primary culture system is a sensitive *in vitro* model for assessing exposure to cytotoxic agents under more environmentally realistic conditions.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the EU-Commission for financial support via the INTEREG IV A Programme CHRONEXPO. The authors thank L. Poulain and M. Duval (Plateau Technique de Cytométrie en Flux, IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie) for their helpful technical assistance in flow cytometry studies, the technical staff of the C.R.E.C. for their assistance in animal care and Elsevier Language Editing Services for English revision.

## References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999. Toxicological Profile for Cadmium. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, pp. 439.
- Asokan, R., Arumugan, M., Mullainadhan, P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. Dev. Comp. Immunol. 21, 1–12.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Mar. Environ. Res. 54, 585–589.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in western Mediterranean. Ectotoxicol. Environ. Saf. 63, 393–405.
- Auzoux-Bordenave, S., Domart-Coulon, I., 2010. Marine invertebrate cell culture as tools for biomineralization studies. J. Sci. Hal. Aquat. 2, 42–47.
- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. Dev. Comp. Immunol. 12, 549–559.
- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and oil on haemocyte and Haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Toxicol. in Vitro 22, 1610–1617.
- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M., 1983. Flow cytometry studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. J. Immunol. 130, 1910–1917.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A., 2009. Cytotoxic and genotoxic effects on *in vitro* exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. Comp. Biochem. Physiol. C 150, 50–56.
- Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomas-Guyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapègue, S., 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquat. Toxicol. 78, 149–156.
- Bouilly, K., Bonnard, M., Gagnaire, B., Renault, T., Lapègue, S., 2007. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 58–63.
- Bradford, M.M., 1976. A refined and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 72, 248.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. Toxicology 142, 145–156.

- Cheng, W., Juang, F.M., Chen, J.C., 2004a. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supersexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 295–306.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Chen, J.C., 2004b. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supersexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 193–202.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H., Chen, J.C., 2004c. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supersexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 235–243.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Chen, J.C., 2004d. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supersexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Dis. Aquat. Organ.* 60, 157–164.
- Chiffolleau, J.-F., Gonzalez, J.-L., Miramand, P., Thouvenin, B., 2001. Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme Scientifique Seine Aval, 10. Ifremer, Paris.
- Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guignonis, J.-M., Samson, M., Roméo, M., Bebianno, M.J., 2009. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquat. Toxicol.* 94, 300–308.
- Chou, I.-N., 1989. Distinct cytoskeletal injuries induced by As, Cd, Co, Cr, and Ni compounds. *Biomed. Environ. Sci.* 2, 358–365.
- Cima, F., Marin, M.G., Matozzo, V., Da Ros, L., Ballarin, L., 1999. Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). *Mar. Pollut. Bull.* 39, 112–115.
- Coles, J.A., Pipe, R.K., 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 337–352.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1994. Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 30, 367–379.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel, *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Org.* 30, 367–379.
- Crompton, T.R., 1997. *Toxicants in Aqueous Ecosystem*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Dailianis, S., 2009. Production of superoxides and nitric oxide generation in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) after exposure to cadmium: a possible involvement of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in the induction of cadmium toxic effects. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 446–453.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P., Colombo, R., 2001. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Rad. Biol. Med.* 31, 1624–1631.
- Domart-Coulon, I., Doumenc, D., Auzoux-Bordenave, S., Le Fichant, Y., 1994. Identification of media supplements that improve the viability of primary cell cultures of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology* 16, 109–120.
- Domart-Coulon, I., Auzoux-Bordenave, S., Doumenc, D., Khalanski, M., 2000. Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures. *Toxicol. in Vitro* 14, 245–251.
- Duchemin, M., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., Fournier, M., 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures. *Environ. Pollut.* 153, 416–423.
- Fagotti, A., Di Rosa, I., Simoncelli, F., Pipe, R.K., Panara, F., Pascolini, R., 1996. The effects of copper on actin and fibronectin organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 20, 383–391.
- Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. in Vitro* 15, 477–488.
- Ferreira, A.C., Costa, A.C.S., Korn, M.G.A., 2004. Preliminary evaluation of the cadmium concentration in seawater of the Salvador city, Brazil. *Microchem. J.* 78, 77–83.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 501–512.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol. Toxicol.* 22, 1–14.
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10, 5–23.
- Gomez-Mendikute, A., Cajaraville, M.P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo(a)pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. in Vitro* 17, 539–546.
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W.-B., Wang, K.-J., 2009. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 75, 389–397.
- Grenfeldt, D., Dahlgren, C., 2001. An intact cytoskeleton is required for prolonged respiratory burst activity during neutrophil phagocytosis. *Inflammation* 25, 165–169.
- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M., Ratcliffe, N.A., 1996. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 34, 273–290.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249–265.
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 433–440.
- Hernandez-lopez, J., Gollas-Galvan, T., Gomez-Jimenez, S., Portillo-Clark, G., Vargas-Albores, F., 2003. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the phenoloxidase is located in plasma not in hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 14, 105–114.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., Benkendorff, K., 2007. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 363–379.
- Kaloyianni, M., Ragia, V., Tzeranaki, I., Dailianis, S., 2006. The influence of Zn on signalling pathways and attachment of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes to extracellular matrix proteins. *Comp. Biochem. Physiol. C* 144, 93–100.
- Koutsogiannaki, S., Evangelinos, N., Koliakos, G., Kaloyianni, M., 2006. Cytotoxic mechanisms of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  involve  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE) activation by ROS. *Aquat. Toxicol.* 78, 315–324.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* haemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225–240.
- Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2001. Acinar primary cell culture from the digestive gland of *Pecten maximus* (L.): an original model for ecotoxicological purposes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259, 171–187.
- Lebel, J.-M., Giard, W., Favrel, P., Boucaud-Camou, E., 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell* 86, 67–72.
- Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzyme characterisation of the circulating hemocytes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Fish Shellfish Immunol.* 7, 595–608.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357–365.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 129, 189–196.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon. *Aquat. Toxicol.* 48, 75–85.
- Luna-Gonzales, A., Maeda-Martinez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 275–282.
- Marchi, B., Burlando, B., Moore, M.N., Viarengo, A., 2004. Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dependent phospholipase A2 activation. *Aquat. Toxicol.* 66, 197–204.
- Marigomez, J.A., Cajaraville, M.P., Angulo, E., 1990. Cellular cadmium distribution in the common wrinkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94, 191–199.
- Mateo, D.R., Spurmanis, A., Siah, A., Araya, M.T., Kulka, M., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009. Changes induced by two strains of *Vibrio splendidus* in haemocyte subpopulations of *Mya arenaria*, detected by flow cytometry with LysoTracker. *Dis. Aquat. Org.* 86, 253–262.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D.M., Marin, M.G., 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 163–170.
- May, R.C., Machesky, L.M., 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114, 1061–1077.
- McIntosh, L.M., Robinson, W.E., 1999. Cadmium turnover in the hemocytes of *Mercuraria mercenaria* (L.) in relation to hemocyte turnover. *Comp. Biochem. Physiol.* C 123, 61–66.
- Milzani, A., Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Lusini, L., Di Simplicio, P., Colombo, R., 2001. From actin oxidation to cell misfunctionings: attempting to overcome the gap by a cytoskeletal bridge. *Rec. Res. Dev. Biophys. Biochem.* 1, 125–143.
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Fieth, P.E.M., 1994. Lysosomal responses to experimentally injected atrazine in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 48, 297–302.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mottin, E., Caplat, C., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2010. Effect of in vitro exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 846–853.
- Nzengue, Y., Steiman, R., Garrel, C., Lefèvre, E., Guiraud, P., 2008. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCat cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology* 243, 193–206.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M.P., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol. in Vitro* 15, 511–517.
- Poncet, J.-M., Serpentine, A., Thiébot, B., Villers, C., Bocquet, J., Boucaud-Camou, E., Lebel, J.-M., 2000. In vitro synthesis of proteoglycans and collagen in primary cultures of mantle cells from the nacreous mollusk, *Haliotis tuberculata*: a new model for study of molluscan extracellular matrix. *Mar. Biotechnol.* 2, 387–398.
- Riinkevich, B., 2005. Marine invertebrate cell cultures: new millennium trends. *Mar. Biotechnol.* 7, 429–439.

- Roesijadi, G., Brubacher, L.L., Unger, M.E., Anderson, R.S., 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C* 118, 171–176.
- Sahaphong, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Riengrojpitak, S., Kangwanrangsang, N., Viyanant, V., Upatham, E.S., Pumthong, T., Chansue, N., Sobhon, P., 2001. Morphofunctional study of the hemocytes of *Haliotis asinina*. *J. Shellfish Res.* 20, 711–716.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sénécal, L., Goudreau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat. Toxicol.* 58, 189–200.
- Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224, 163–183.
- Serpentini, A., Ghayor, C., Hebert, V., Galéra, P., Pujol, J.-P., Boucaud-Camou, E., Lebel, J.-M., 2000. *De novo* synthesis and identification of collagen transcripts in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.* 287, 275–284.
- Shuilleabhain, S.N., Mothershill, C., Sheehan, D., O'Brien, N.M., O'Halloran, J., van Pelt, F., Kilemade, M., Davoren, M., 2006. Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 332–341.
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M., 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Biol.* 207, 3369–3380.
- Song, J., Lee, S.C., Kim, S.S., Koh, H.J., Kwon, O.W., Kang, J.J., Kim, E.K., Shin, S.H., Lee, J.H., 2004. Zn<sup>2+</sup>-induced cell death is mediated by the induction of intracellular ROS in ARPE-19 cells. *Curr. Eye Res.* 28, 195–201.
- Soto, M., Cajaraville, M.P., Marigomez, I., 1996. Tissue and cell distribution of copper, zinc and cadmium in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, determined by autometallography. *Tissue Cell* 28, 557–568.
- Snyman, R.G., Odendaal, J.P., 2009. Effect of cadmium on haemocyte viability of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda, Crustacea). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 525–529.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 321–336.
- Travers, M.-A., Mirella Da Silva, P., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008a. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 400–411.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008b. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 800–808.
- Van der Merwe, M., Auzoux-Bordenave, S., Niesler, C., Roodt-Wilding, R., 2010. Investigating the establishment of primary cell culture from different abalone (*Haliotis midae*) tissues. *Cytotechnology* 62, 265–277.
- Via, L.E., Fratti, R.A., McFalone, M., Pagan-Ramos, E., Deretic, D., Deretic, V., 1998. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J. Cell Sci.* 111, 897–905.
- Zhou, J., Cai, Z.-H., Zhu, X.-S., Li, L., Gao, Y.-F., 2010. Innate immune parameters and haemolymph protein expression profile to evaluate the immunotoxicity of tributyltin on abalone (*Haliotis diversicolor supersexta*). *Dev. Comp. Immunol.* 34, 1059–1067.







## Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures

Elmina Mottin<sup>a,b,c,d</sup>, Christelle Caplat<sup>c</sup>, Thomas Latire<sup>a,b</sup>, Antoine Mottier<sup>a,b</sup>, Marie-Laure Mahaut<sup>c</sup>, Katherine Costil<sup>a,b</sup>, Daniel Barillier<sup>c</sup>, Jean-Marc Lebel<sup>a,b</sup>, Antoine Serpentine<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR 100 IFREMER "Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins", IFR 146 ICORE – IBFA, Université de Caen Basse-Normandie, Campus 1, Bat M, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France

<sup>b</sup> FRE 3484 BioMEA, CNRS INEE, Université de Caen Basse-Normandie, Campus 1, Bat M, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France

<sup>c</sup> Equipe de Recherche en Physico-Chimie et Biotechnologie, EA 3914, Université de Caen Basse-Normandie, Hall Technologique, 145 Chemin de la Crespinière BP 48, 50130 Cherbourg-Octeville, France

<sup>d</sup> CNAM-Intechmer, Digue de Collignon, BP 324, 50103 Tourlaville, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Zinc  
Sacrificial anode  
*Crassostrea gigas*  
Laboratory exposures  
Immune parameters  
mRNA expression

### ABSTRACT

Two types of exposures were performed to assess the effects of zinc released from sacrificial anode degradation: a chronic exposure, in which oysters were exposed to  $0.53 \pm 0.04 \text{ mg Zn L}^{-1}$  for 10 weeks, and an acute exposure, where oysters were exposed to  $10.2 \pm 1.2 \text{ mg Zn L}^{-1}$  for 1 week. At the end of the acute exposure experiment, 81.8% mortality was recorded. In contrast, no mortality was detected after 10 weeks exposure. Moreover, all of the immune system biomarkers studied, except the number of circulating haemocytes, were stimulated by a moderate level of zinc and inhibited by a high level. Our exposure conditions did not induce SOD or MXR mRNA expression in gills and digestive gland. However, an increase of MT mRNA is observed in these tissues. The results indicate that oysters are sensitive to acute zinc toxicity but are only moderately affected by a mild zinc concentration.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Marine ecosystems are continuously subjected to anthropogenic activities that introduce various pollutants into seawater. Among these pollutants, heavy metals, including zinc, lead to pollution all around the world. Zinc concentrations measured in coastal waters of unpolluted and polluted sites range from 0.3 to 300  $\mu\text{g/L}$  (Bird et al., 1996; Terrés-Martos et al., 2002; Baudrimont et al., 2005; Daby, 2006; Hamed and Emara, 2006; El Ati-Hellal et al., 2007). However, extremely high zinc concentrations, ranging from 1.8  $\text{mg L}^{-1}$  to 6  $\text{mg L}^{-1}$ , have been reported in specific areas (Amado Filho et al., 1997; Srinivasa et al., 2005). The anthropogenic sources of zinc are mainly industry, urbanisation and agriculture. In the marine environment, zinc can also be introduced into water by the degradation of sacrificial anodes. To reduce the corrosion of steel materials, such as boats or harbour structures, sacrificial anodes consisting of a metal with a lower electrode potential than iron (e.g., zinc, magnesium or aluminium) are commonly used. Application of zinc sacrificial anodes has been common since the early 1960s, and anodes of zinc are the most often used type of these anodes for marine protection applications (Bird et al., 1996;

Wagner et al., 1996). However, this cathodic protection induces the release of dissolved zinc due to degradation of sacrificial anodes. Although the quantity of zinc released from sacrificial anodes into the marine environment is difficult to assess, it is thought to be very large (Wagner et al., 1996). Few studies focused on metal released from sacrificial anode and affecting marine organisms. Recently, Caplat et al. (2010) evaluated the effect of aluminium or zinc released from sacrificial anode by comparison to their traditional sulphate salt. Using sea urchin embryos and sperm bioassays, these authors observed differences in effects and demonstrated a lesser toxicity, up to hormesis, of zinc linked to anode compare to sulphate salt.

Zinc is an essential metal for all living organisms. This metal is a cofactor over 300 enzymes (Vallee and Falchuk, 1993) and plays an important role in immune responses, antioxidant defence systems, energetic metabolism, reproduction, cell division and regulation of DNA transcription (Salgueiro et al., 2000). However, when present in excess, zinc is potentially toxic to organisms, and numerous studies have demonstrated the lethality of zinc in algae (Amado Filho et al., 1997) and in invertebrates (Wiklund et al., 2006). Moreover, it can also have deleterious effects on embryonic development and larval growth of bivalves (Brereton et al., 1973; Bellas et al., 2005; Jorge and Moreira, 2005) as well as on the immune system of vertebrates (Dardenne, 2002).

In molluscs, haemocytes, which are circulating cells present in haemolymph, play a key role in innate immunity. These cells are

\* Corresponding author at: FRE 3484 BioMEA, CNRS INEE, Université de Caen Basse-Normandie, Campus 1, Bat M, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France. Tel.: +33 2 31 56 56 80; fax: +33 2 31 56 53 46.

E-mail address: [antoine.serpentine@unicaen.fr](mailto:antoine.serpentine@unicaen.fr) (A. Serpentine).

responsible for phagocytosis, pathogen hydrolysis, the production of reactive oxygen species (ROS) and the phenoloxidase cascade (Galloway and Depledge, 2001). In bivalves, some authors have shown that haemocyte functions can be modulated by certain contaminants, including heavy metals (Coles et al., 1995; Auffret et al., 2002; Bouilly et al., 2006; Thiagarajan et al., 2006; Girón-Perez, 2010). For example, Auffret et al. (2002) reported that the phagocytic activity in the total haemocyte population of the European flat oyster *Ostrea edulis* showed a 50% decrease compared to a control when these organisms were exposed to 10  $\mu\text{M}$  cadmium.

To analyse the effects of environmental pollutants, multiparametric approaches have been used. Flow cytometry has classically been used for the analysis of suitable biomarkers, including phagocytosis, ROS production and non-specific esterase activity (Brousseau et al., 2000; Sauvé et al., 2002; Auffret, 2005; Gagnaire et al., 2006; Duchemin et al., 2008). Based on quantification of mRNA levels, some authors have proposed that genes involved in the regulation of oxidative stress (superoxide dismutase (SOD), metallothionein (MT)) (Otero et al., 1996; Cai et al., 1999; Guo et al., 2003) and cell detoxification (multidrug resistance (MDR)) (Farcy et al., 2009) could be suitable biomarkers for metal contamination in field studies addressing molluscs (Bordin et al., 1997; Mouneyrac et al., 1998; Hansen et al., 2006; Saez et al., 2008). MTs are small proteins ( $\sim 7$  kDa) that have the ability to sequester metals, acting in a protective function role (Roesijadi, 1992; Amiard et al., 2006). SOD is responsible for protecting organisms from oxidative stress by catalysing the conversion of superoxide anions into hydrogen peroxide. SOD is used to assess the effects of environmental pollutants on marine organisms, including bivalves (Bebiano et al., 2004). MDR plays an important role in the multixenobiotic resistance (MXR) system, helping to pump contaminants out of the cell to reduce them below toxic levels (Bard, 2000; Minier et al., 2002). This mechanism is similar to the MDR phenomenon first described in mammalian tumour cell lines.

Bivalve molluscs, such as the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, are frequently used in ecotoxicological studies as model organisms because they filter large amounts of water for respiratory and nutritional purposes and are able to accumulate pollutants (Bouilly et al., 2006; Gagnaire et al., 2007; Bado-Nilles et al., 2008; Choi et al., 2008; Jo et al., 2008).

To investigate the effects of zinc resulting from the degradation of sacrificial anodes on *C. gigas*, experiments were performed using two exposure designs: chronic and acute exposures. The chronic exposure experiment consisted of exposing oysters to zinc at a concentration of  $0.53 \pm 0.04 \text{ mg Zn L}^{-1}$  for 10 weeks, which is typical of the pollution levels observed in some anthropogenic areas (Bird et al., 1996; Terrés-Martos et al., 2002; Baudrimont et al., 2005; Daby, 2006; Hamed and Emara, 2006; El Ati-Hellal et al., 2007). The acute exposure was carried out for 7 days at a concentration of  $10.2 \pm 1.2 \text{ mg Zn L}^{-1}$ . This experiment mimicked strongly contaminated areas (Amado Filho et al., 1997; Srinivasa et al., 2005). Haemocyte parameters, including phagocytosis capacity, production of ROS and non-specific esterase activity, were monitored using flow cytometry, and phenoloxidase activity was measured by spectrophotometry. mRNAs associated with oxidative stress (SOD and MT) and cell detoxification (MDR1) were quantified using real-time PCR on samples from gills and digestive glands.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Three years old, diploid Pacific oysters, *C. gigas*, were obtained from an oyster farm located in Normandy (France). All of the

oysters spent their entire growing life on this farm. The oysters were acclimatised to laboratory conditions for 1 month before the experiments were performed in a tank containing natural seawater. The water was continuously aerated and renewed. During acclimatisation and the experiments, no external food (apart from that provided by natural seawater) was added.

### 2.2. Experimental unit design

Seawater was directly collected in the small fishing harbour of Les Flamands. This harbour is located east of the port of Cherbourg (Basse-Normandie, France). Seawater was decanted twice before being filtered to remove particles in suspension. Then it was transported to two 80 L tanks. One 80 L tank was equipped with an electrochemical device. Each 80 L tank was connected with a high-density polyethylene (HDPE) experimental unit of 500 L that contained oysters. Seawater was continuously renewed (10 L/h) and oxygenated. Physical and chemical parameters (pH, temperature, dissolved  $\text{O}_2$ ) were continuously controlled, and salinity was measured one time per day with multi-parametric meters (Orion-5-Star). The temperature of the experimental units followed the temperature of natural seawater; the difference in temperature between natural seawater and the experimental unit was lower than 2 °C.

### 2.3. Electrochemical device

To accelerate anode degradation and simulate the zinc transfer in seawater, an electrochemical device was installed in one 80 L tank, as described previously (Caplat et al., 2010). This device was constructed using one reference saturated calomel electrode (SCE) and one colter electrode (CE) in platinum–titanium alloy. The electrodes were connected to a zinc anode (min. of 99.31% zinc, US-MIL-A1800.1K Norm), with the whole system being electrically linked to a general purpose potentiostat (AMEL instruments, Model 2049, Milan, Italy). The role of the SCE electrode was to stabilise the anode potential; control of the intensity was linked to the total zinc concentration required in the experimental unit (Fig. 1). With this device, the chemical forms of zinc(II) released from anodes were reproduced as in natural conditions.

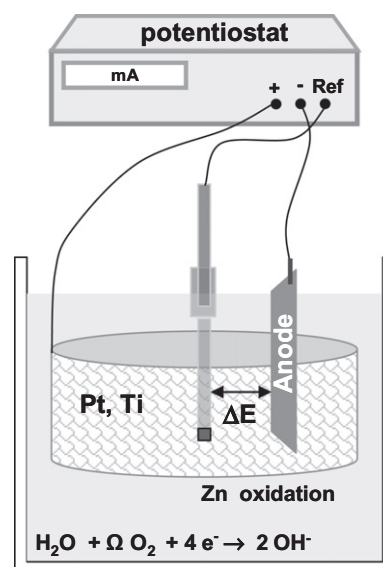


Fig. 1. Electrochemical device scheme with zinc anode and potentiostat.



## 2.4. Zinc exposure

Two exposures were performed. The first consisted of a chronic exposure in which 166 oysters were exposed to  $0.53 \pm 0.04 \text{ mg Zn L}^{-1}$  for 10 weeks. The second experiment employed an acute exposure in which 100 oysters were exposed to  $10.2 \pm 1.2 \text{ mg Zn L}^{-1}$  for 1 week. Fifteen oysters per experimental unit (control and exposed) were sampled at different periods during the experiments (0.2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 10 weeks for the chronic exposure and 24, 48, 96 and 168 h for the acute exposure).

## 2.5. Collection of haemolymph and total haemocyte counts (THC)

For each oyster sampled, haemolymph was drawn from the pericardial cavity using a syringe equipped with a 25-gauge sterile needle. Haemolymph was transferred to a sterile tube and immediately diluted 1:10 in cooled, sterile, anti-coagulant modified Alsever's solution (115 mM glucose, 27 mM sodium citrate, 11.5 mM EDTA and 382 mM NaCl) (Bachère et al., 1988). For each sampling, three pools of five oysters each were used. Each tube containing haemolymph was centrifuged ( $500 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) to pellet the haemocytes. Then the supernatant was removed and used for the measurement of phenoloxidase activity. The haemocytes were resuspended in 1 mL of sterile artificial seawater (436 mM NaCl, 53 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM HEPES, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl).

For each pool, haemocytes were counted using a Thoma counting chamber under an inverted microscope (Leica, DM IRB/E) to determine the haemocyte concentration.

## 2.6. Flow cytometry analysis

Flow cytometry analyses were conducted as previously described (Mottin et al., 2010). Briefly, fluorescence was recorded using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter) at 505–545 nm excitation wavelengths corresponding to the FL1 channel. Twenty thousand events were counted for each sample. The results were expressed as cell cytograms indicating the size (FSC value), the complexity (SSC value) and the level of fluorescence of the cell samples using the FL1 channel. For each pool, three replicates were analysed.

### 2.6.1. Phagocytosis capacity

Phagocytosis activity was measured as the proportion of haemocytes that ingested three or more fluorescent beads (carboxylate-modified FluoroSpheres®, yellow–green fluorescence,  $1 \mu\text{m}$  diameter, Molecular Probes). Haemocytes from each replicate were incubated with bead solution for 1 h in the dark at  $17^\circ\text{C}$ . The final ratio of beads:haemocytes was 100:1.

### 2.6.2. Reactive oxygen species (ROS) production

ROS production was evaluated using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma) method (Bass et al., 1983) as adapted for oyster cells by Lambert et al. (2003). DCFH-DA was

added to each replicate at a final concentration of  $10 \mu\text{M}$ , and haemocytes were incubated for 1 h at  $17^\circ\text{C}$  in the dark.

### 2.6.3. Non-specific esterase activity

Esterase activity was measured using the non-specific liposoluble substrate fluorescein diacetate (FDA, Molecular Probes). Haemocytes were incubated for 15 min at  $17^\circ\text{C}$  in the dark with FDA at a final concentration of  $1 \mu\text{M}$ .

Following the incubations, haemocyte samples were centrifuged ( $500 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). The supernatants were removed, and  $300 \mu\text{L}$  of paraformaldehyde was added (3% in phosphate buffer saline, PBS) to fix the cells. Samples were then incubated for 30 min at  $25^\circ\text{C}$ . Finally,  $200 \mu\text{L}$  of PBS was added, and the samples were stored at  $4^\circ\text{C}$  in the dark until analysis.

### 2.7. Phenoloxidase activity

The phenoloxidase activity in cell-free haemolymph was measured by recording the formation of dopachrome produced from 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, Sigma) (Hernandez-Lopez et al., 2003). Transformation was monitored by spectrophotometry at 492 nm. For a  $250 \mu\text{L}$  sample,  $250 \mu\text{L}$  of Tris (10 mM)/NaCl (150 mM) buffer at pH 8,  $250 \mu\text{L}$  of cacodylate buffer (10 mM, pH 7) and  $250 \mu\text{L}$  of L-DOPA (3 mg/mL) were added. Samples were incubated for 1 h before absorbance was measured. Phenoloxidase activity was expressed as an arbitrary unit.

### 2.8. Quantification of mRNA expression

Quantification of mRNA expression was conducted as previously described (Farcy et al., 2007, 2009).

#### 2.8.1. RNA extraction

For analysis of mRNA expression, gills and digestive glands were dissected at different periods during experiments (see Section 2.4). For each sampling, three pools of four oysters each were used. Total RNA was extracted with Tri Reagent (Sigma) at a concentration of 1 mL/100 mg of tissue. Quality control and quantification of RNA were performed using a Nano-Drop 2000 (Thermo scientific). The RNA was treated with DNase I ( $1 \text{ U}/\mu\text{L}$ , Sigma–Aldrich) at room temperature for 20 min to remove any DNA contaminants.

#### 2.8.2. Real-time PCR and analysis

Reverse transcription was carried out using 700 ng of total RNA treated with DNase I, 500 ng random primers (Promega), 200 U Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT, Promega), 25 U RNasin (Promega) and 0.5 mM dNTPs (Promega). The sequences of the forward and reverse primers were designed using Primer3 software ([http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) and synthesised by Eurogentec (Table 1). Real-time PCR was performed in a MiQ Cycler (Biorad). All procedures were carried out in duplicate. Controls of non-template cDNA were included in the PCR experiments. Ampli-

**Table 1**  
Primer sequences and accession number.

Gene	GenBank accession #	Forward primer	Reverse primer
Actin	AF026063	5' GCCCTGGACTTCGAACAA 3'	5' CGTTGCCAATGGTGATGA 3'
SOD <sup>a</sup>	AJ496219	5' AACCCCTTCAACAAAGAGCA 3'	5' TTGGCGACACCGTCTTC 3'
MT <sup>b</sup>	AJ243263, AJ242657	5' GGACCGGAAACTGCAAA 3'	5' CCAGTGCATCCTTTACCACA 3'
MDR1	AJ422120	5' CCGAGAACATCCGCTACG 3'	5' GCCTGTGGGAGTTCCTT 3'

<sup>a</sup> The amino acid translation of the Genbank #AJ496219 sequence is highly homologous to a Cu–Zn SOD.

<sup>b</sup> This pair of primers did not discriminate between two identified members of oyster MTs: MT1 (accession # AJ243263) and MT2 (accession # AJ242657).

fication was performed in 96-well plates in a total volume of 15  $\mu$ L containing cDNA samples obtained from reverse transcription of 5 ng of total RNA, 7.5  $\mu$ L of 2X iQ SYBR Green supermix (Biorad), and both primer (300 nM final concentration of each primer). The amplification conditions were 40 cycles of 15 s at 95 °C and 45 s at 60 °C, followed by the protocol for the melting curve: 80 cycles of 10 s with an increase of 0.5 °C between each cycle from 55 °C to 95 °C. The melting curve was used to check whether the amplification products exhibited the expected Tm.

To analyse gene expression levels, mRNA quantities were normalised to actin mRNA (Farcy et al., 2007).

## 2.9. Data analysis

Values are expressed as the means  $\pm$  standard deviation of three different pooled oyster samples. Normality (Kolmogorov–Smirnov test) was first checked and the significance of the differences between two samples was determined using the Mann and Whitney U test. These analyses were conducted using Statistica 7.1 software (StatSoft® France, Maison-Alfort, France).

## 3. Results

### 3.1. Effects of zinc exposure on oyster mortality

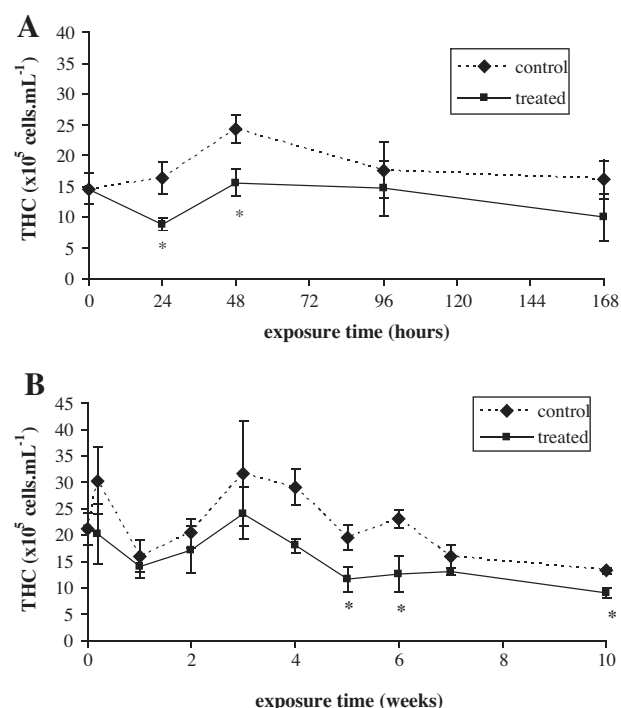
In the acute exposure experiment, mortality was first observed after 24 h of incubation (3.1% mortality) and reached 81.8% at the end of the experiment; in the control tank, no mortality was observed. No mortality was detected in the chronic exposure tank or in the control tank during the experimental period (data not shown).

### 3.2. Total haemocyte counts (THCs)

Exposure of oysters to zinc (acute and chronic experiments) induced a decrease in the THC (Fig. 2). During acute exposure, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was recorded after 24 h and 48 h leading to decreases of 46% and 35%, respectively, compared to the control (Fig. 2A). After 96 h and 168 h, the total haemocyte counts were lower in the treated organisms than the control oysters, but the differences were not statistically significant because of large intra-group variations. In the chronic exposure experiment, haemocyte numbers tended to be lower in the treated group than the control group. These differences were statistically significant ( $p < 0.05$ ) after 5-, 6- and 10-week incubations. In these cases, the variation ranged from 31% to 45% compared to the control (Fig. 2B).

### 3.3. Effects of zinc exposure on immune parameters

Immune parameters were monitored using flow cytometry (phagocytic activity, ROS production and non-specific esterase



**Fig. 2.** Number of circulating haemocytes during acute (A) and chronic (B) zinc exposure in *Crassostrea gigas*. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate. Significant differences from zinc treated organisms in comparison to control within sampling times at  $p < 0.05$  (\*) are indicated.

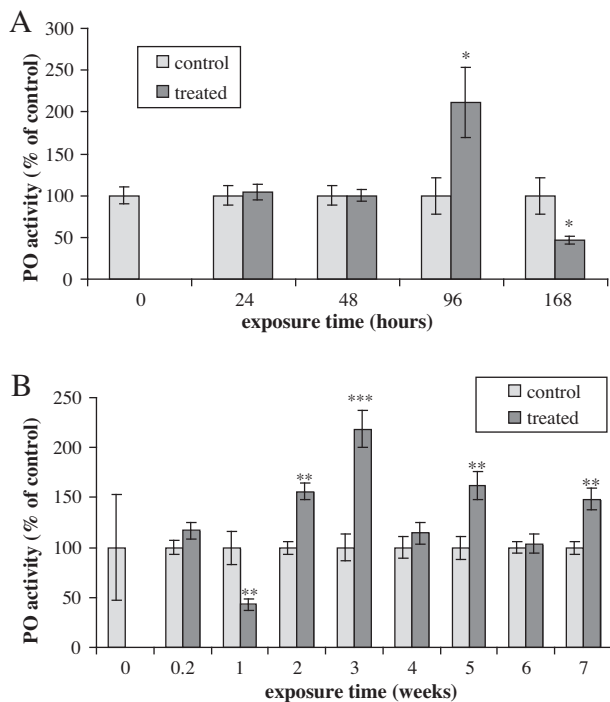
activity) and spectrophotometrically (phenoloxidase activity). Significant decreases in phagocytosis, ROS production and non-specific esterase activity were detected compared to the controls during acute exposure. From 48 h of incubation, decreases of approximately 16% and 36% occurred in phagocytosis and non-specific esterase activity, respectively, and a decrease of 61% was observed after 24 h in ROS production (Table 2). For the phenoloxidase activity (Fig. 3A), an increase of 111% compared to the control was recorded after 96 h of exposure, followed by a decrease of 53% after 168 h of incubation.

With respect to the effects of zinc during chronic exposure, phagocytic activity was significantly induced after 1 week ( $p < 0.001$ ), 2 weeks ( $p < 0.05$ ) and 4 weeks ( $p < 0.05$ ) of exposure compared to the controls and ROS production was significantly induced after 1 week ( $p < 0.05$ ), 5 weeks ( $p < 0.01$ ) and 10 weeks ( $p < 0.01$ ) of exposure compared to the controls. For non-specific esterase activity, significant increases compared to the control group were detected after 4 weeks ( $p < 0.001$ ), 6 weeks ( $p < 0.01$ ) and 7 weeks ( $p < 0.001$ ) of exposure, whereas a slight, but

**Table 2**

Effects of acute exposure to zinc on *Crassostrea gigas* haemocyte immune parameters. For each parameter, the values for the mean  $\pm$  standard deviation of the samples are indicated as well as the percentage of variation between the treated and control specimens at the same sampling time. The statistically significant differences are indicated (Mann and Whitney U tests).

Exposure time (h)		0	24	48	96	168
Phagocytic activity	Control sample	19.5 $\pm$ 0.5	19.5 $\pm$ 0.8	14.5 $\pm$ 0.7	19.9 $\pm$ 0.7	18.0 $\pm$ 0.9
	Treated sample	19.5 $\pm$ 0.5	18.9 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 0.6	20.3 $\pm$ 0.8	13.5 $\pm$ 0.7
	Variation (%)	0	-3	-16 ( $p < 0.05$ )	+2	-25 ( $p < 0.01$ )
ROS production	Control sample	34.1 $\pm$ 2.1	30.6 $\pm$ 1.4	16.9 $\pm$ 0.4	37.6 $\pm$ 3.7	16.2 $\pm$ 1.6
	Treated sample	34.1 $\pm$ 2.1	11.9 $\pm$ 1.3	8.9 $\pm$ 1.7	25.0 $\pm$ 3.8	9.0 $\pm$ 0.7
	Variation (%)	0	-61 ( $p < 0.001$ )	-47 ( $p < 0.001$ )	-34 ( $p < 0.05$ )	-44 ( $p < 0.01$ )
Non-specific esterase activity	Control sample	31.9 $\pm$ 3.6	23.5 $\pm$ 1.8	26.3 $\pm$ 1.4	28.4 $\pm$ 2.4	22.5 $\pm$ 2.2
	Treated sample	31.9 $\pm$ 3.6	19.2 $\pm$ 1.7	16.9 $\pm$ 2.5	21.7 $\pm$ 1.7	16.3 $\pm$ 0.7
	Variation (%)	0	-18	-36 ( $p < 0.01$ )	-24	-28 ( $p < 0.05$ )



**Fig. 3.** Phenoloxidase activity in haemolymph during acute (A) and chronic (B) zinc exposure in the oyster *Crassostrea gigas*. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate samples. Significant differences in zinc-treated specimens compared to controls within a particular sampling time at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*) are indicated.

significant ( $p < 0.05$ ) decrease compared to the controls was observed after 3 weeks of exposure (Table 3). Phenoloxidase activity significantly ( $p < 0.01$ ) decreased by 57% compared to the control group after 1 week of incubation and then increased (Fig. 3B). The maximum level of induction of phenoloxidase activity was observed after 3 weeks of exposure (118% compared to the control).

### 3.4. Effects of zinc on mRNA expression of genes related to stress and detoxification

The effects of zinc on MT, MDR1 and SOD mRNA expression were monitored in two key organs in terms of bioaccumulation:

**Table 3**

Effects of chronic exposure to zinc on *Crassostrea gigas* haemocyte immune parameters. For each parameter, the values for the mean  $\pm$  standard deviation of the samples are indicated as well as the percentage of variation between the treated and control specimens at the same sampling time. The statistically significant differences are indicated (Mann and Whitney U tests).

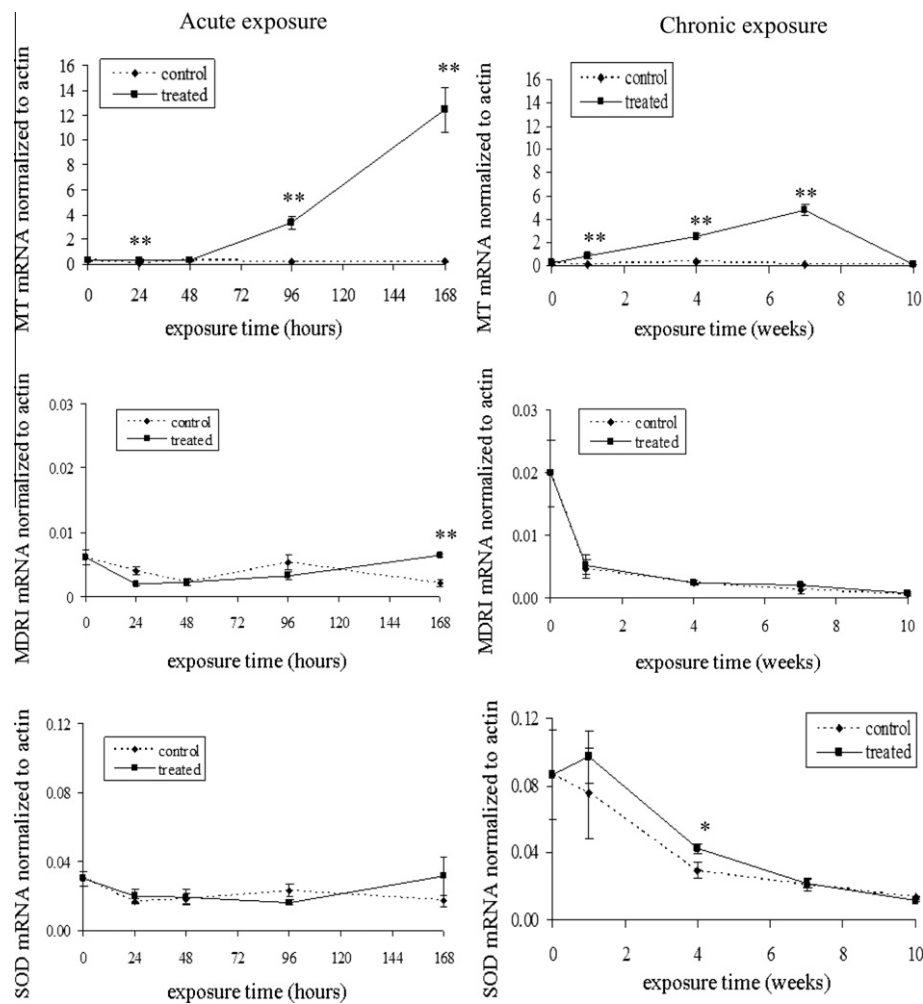
Exposure time (weeks)		0	0.2	1	2	3	4	5	6	7	10
Phagocytic activity	Control sample	20.1 $\pm$ 0.7	21.4 $\pm$ 0.7	19.8 $\pm$ 0.6	21.5 $\pm$ 1.1	21.9 $\pm$ 0.7	16.5 $\pm$ 0.6	16.3 $\pm$ 1.0	22.6 $\pm$ 0.7	21.1 $\pm$ 0.6	19.6 $\pm$ 0.6
	Treated sample	20.1 $\pm$ 0.7	22.9 $\pm$ 1.1	24.4 $\pm$ 0.4	25.3 $\pm$ 0.9	23.2 $\pm$ 0.5	19.0 $\pm$ 0.6	18.1 $\pm$ 1.0	21.1 $\pm$ 0.5	19.9 $\pm$ 0.9	21.4 $\pm$ 0.8
	Variation (%)	0	+7	+24 ( $p < 0.001$ )	+18 ( $p < 0.05$ )	+6	+15 ( $p < 0.05$ )	+11	–7	–6	+9
ROS production	Control sample	14.1 $\pm$ 3.3		15.7 $\pm$ 2.3	38.0 $\pm$ 5.5	17.3 $\pm$ 1.5	15.5 $\pm$ 2.6	16.0 $\pm$ 2.1	47.7 $\pm$ 4.9	44.0 $\pm$ 2.3	23.3 $\pm$ 0.9
	Treated sample	14.1 $\pm$ 3.3		25.2 $\pm$ 2.5	47.8 $\pm$ 2.4	21.9 $\pm$ 2.4	22.0 $\pm$ 2.7	29.5 $\pm$ 2.1	42.1 $\pm$ 1.5	36.6 $\pm$ 2.6	29.5 $\pm$ 1.6
	Variation (%)	0	–11	+60 ( $p < 0.05$ )	+26	+27	+41	+85 ( $p < 0.01$ )	–12	–17	+27 ( $p < 0.01$ )
Non-specific esterase activity	Control sample	76.3 $\pm$ 2.2	82.1 $\pm$ 2.2	68.5 $\pm$ 4.4	66.7 $\pm$ 2.7	82.5 $\pm$ 1.1	57.3 $\pm$ 2.0	67.6 $\pm$ 2.0	77.2 $\pm$ 1.2	65.9 $\pm$ 2.1	68.6 $\pm$ 2.3
	Treated sample	76.3 $\pm$ 2.2	79.1 $\pm$ 3.0	75.4 $\pm$ 2.2	66.4 $\pm$ 2.4	76.4 $\pm$ 2.3	79.9 $\pm$ 2.6	71.0 $\pm$ 1.8	82.7 $\pm$ 1.0	79.2 $\pm$ 1.6	74.7 $\pm$ 1.9
	Variation (%)	0	–4	+10	0	–7 ( $p < 0.05$ )	+39 ( $p < 0.001$ )	+5	+7 ( $p < 0.01$ )	+20 ( $p < 0.001$ )	+9

gills and digestive glands. In gills, the main effects of zinc were recorded for MT mRNA expression under both the acute and chronic exposures (Fig. 4). We detected 17-fold ( $p < 0.01$ ) and 74-fold ( $p < 0.01$ ) inductions compared to the control group in the acute exposure experiment after 96 h and 168 h of incubation, respectively. During chronic exposure, MT mRNA expression in the treated group was increased by 5-fold ( $p < 0.01$ ), 8-fold ( $p < 0.01$ ) and 32-fold ( $p < 0.01$ ) compared to the controls after 1, 4 and 7 weeks of exposure, respectively. However, after 10 weeks, the MT mRNA level decreased to the level of the control group. The MDR1 mRNA level was significantly increased by zinc exposure (3-fold compared to the control;  $p < 0.01$ ) after 168 h of exposure in the acute exposure experiment. No significant differences were detected between the treated group and the control group in the chronic exposure experiment. Concerning the SOD mRNA level, a slight, but significant ( $p < 0.05$ ) difference was observed between control and treated samples after 4 weeks of exposure under chronic exposure, whereas no significant differences appeared in the acute exposure experiment.

In digestive glands, the MT mRNA levels were significantly increased compared to the controls in the acute exposure experiment (Fig. 5). Inductions of 2-fold ( $p < 0.05$ ), 4-fold ( $p < 0.01$ ) and 7-fold ( $p < 0.01$ ) were observed after 48 h, 96 h and 168 h, respectively. Under chronic exposure, the MT mRNA level in the treated group was induced ( $p < 0.01$ ) by 2.7-fold compared to the controls after 4 weeks of exposure. Additionally, the level of MDR1 expression was significantly ( $p < 0.05$ ) elevated by 1.7-fold compared to the controls after 48 h of exposure in the acute experiment, whereas no significant differences were recorded between the treated group and the control group under chronic exposure. In the chronic exposure experiment, a slight (1.5-fold) significant ( $p < 0.05$ ) increase in the SOD mRNA level compared to the control was detected after 1 week of exposure, whereas a significant ( $p < 0.01$ ) decrease (1.9-fold) compared to the control was observed after 7 weeks of exposure. No significant differences were recorded between the treated group and the control group with respect to the SOD mRNA levels under acute exposure.

### 4. Discussion

In this study, we performed chronic and acute exposure experiments to monitor the effects of zinc released due to the degradation of a sacrificial anode on stress mRNA expression in both gills



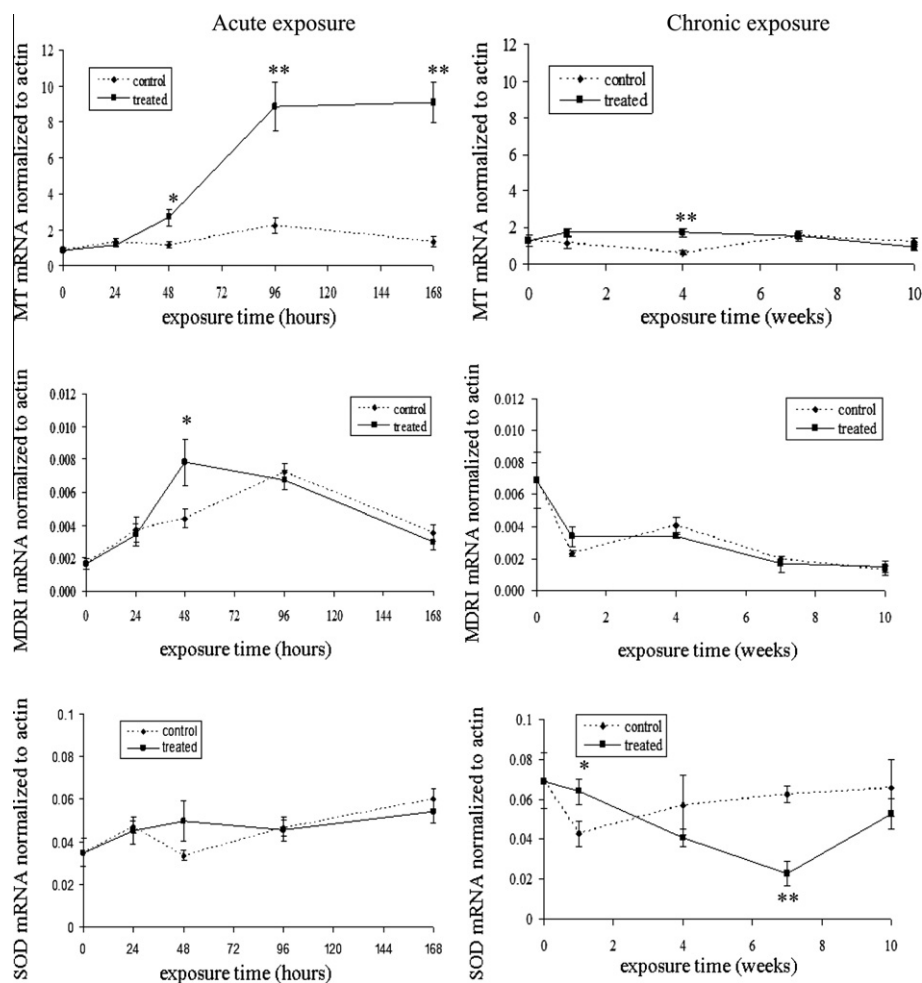
**Fig. 4.** Expression of MT, MDR1 and SOD mRNA in gills in response to acute or chronic zinc exposure in *Crassostrea gigas*. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate samples. Significant differences between zinc-treated specimens compared to controls within a particular sampling time at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*) are indicated.

and digestive glands as well as immune parameters of the Pacific oyster, *C. gigas*. Haemocytes constitute the cellular defence system of invertebrates, and the total number of circulating haemocytes (THC) is an appropriate biomarker for monitoring pollution. In this study, we showed that zinc induced a decrease in THCs during both exposure conditions. Our results are in accordance with results published by Lorenzon et al. (2001). These authors exposed the shrimp *Palaemon elegans* to different heavy metals, including zinc, and concluded that heavy metal exposure provokes a THC decrease. Decreases in the number of circulating haemocytes due to heavy metals have also been detected in the mussel *Mytilus edulis* (Parry and Pipe, 2004), in two crab species, *Scylla serrata* and *Paratelphusa hydrodromous* (Victor, 1993; Vijayavel et al., 2009), and in the ant *Formica aquilonia* (Sorvari et al., 2007). Different hypotheses have been proposed to explain this phenomenon. A decrease in haemocyte numbers could be a consequence of cell lysis, reduced haemopoiesis or migration of haemocytes from the circulatory system into tissues (Pipe and Coles, 1995; Parry and Pipe, 2004; Hannam et al., 2009). Considering the results of the present study, we are not able to reach a conclusion regarding the reasons that decreased numbers of haemocytes were observed, and further experiments should be conducted to test these hypotheses.

Phagocytosis, ROS production and non-specific esterase activity are also good biomarkers allowing the assessment of the immunotoxicity of xenobiotics. These haemocyte parameters are frequently

studied using flow cytometry (Gagnaire et al., 2007; Bado-Nilles et al., 2008; Morga et al., 2011). Our results showed increases in haemocyte parameters when oysters were exposed to  $0.5 \text{ mg Zn L}^{-1}$  for 10 weeks. In contrast, significant decreases were observed under exposure to  $10 \text{ mg Zn L}^{-1}$  from 48 h onward. Some studies in bivalves have demonstrated that haemocyte activity may be stimulated by moderate levels of heavy metals and inhibited by high levels (Perez and Fontanetti, 2010). This phenomenon could be termed hormesis, as hormesis is the name given to phenomena in which opposite effects are observed at low compared to high doses for a given measured parameter (Stebbing, 1982; Calabrese and Blain, 2011). A hormetic effect of zinc has previously been observed by Pagano et al. (1986) and more recently by Caplat et al. (2010) in the sea urchin. Moreover, some studies have demonstrated that phagocytosis may be stimulated by heavy metals in bivalves (Cheng and Sullivan, 1984; Cheng, 1988; Pipe et al., 1999; Brousseau et al., 2000; Sauvé et al., 2002; Parry and Pipe, 2004; Duchemin et al., 2008). For example, haemocytes of the mussel *M. edulis* exposed *in vivo* to concentrations of copper and mercury chloride exhibit stimulated phagocytic activity (Pipe et al., 1999; Duchemin et al., 2008). Similar results have also been observed for haemocytes of various invertebrates exposed to zinc (Brousseau et al., 2000; Sauvé et al., 2002; Filipiak et al., 2010). For all living organisms, zinc is an essential trace element that plays a key role in the immune system. It is possible that a low





**Fig. 5.** Expression of MT, MDR1 and SOD mRNA in digestive gland in response to acute or chronic zinc exposure in *Crassostrea gigas*. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate samples. Significant differences between zinc-treated specimens compared to control within a particular sampling times at  $p < 0.05$  (\*), and  $p < 0.01$  (\*\*) are indicated.

level of this metal directly stimulates the process of phagocytosis. In contrast, our results showed inhibition of phagocytosis when oysters were exposed to  $10 \text{ mg Zn L}^{-1}$ . Some authors have shown a decrease of this activity in haemocytes of different bivalve species exposed to heavy metals (Coles et al., 1995; Fournier et al., 2001; Auffret et al., 2002; Thiagarajan et al., 2006; Duchemin et al., 2008). Bouilly et al. (2006) have observed that cadmium also induces a reduction of phagocytic activity in haemocytes of *C. gigas* exposed to a concentration of  $50 \text{ ng L}^{-1}$  for 21 days. The process of phagocytosis is dependent on membrane properties, and some authors have suggested that the inhibition of phagocytosis may thus be due to alterations in the cell membrane (Grundy et al., 1996; Hannam et al., 2009). It has been shown that heavy metal exposure can lead to cytoskeletal alterations (Cima et al., 1998). This disorganisation of the cytoskeleton can result in inhibition of the mobility of haemocytes. Moreover, zinc and other heavy metals are known to exhibit a high affinity for the SH groups of proteins, including  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (Viarengo and Nicotera, 1991). In haemocytes of *M. edulis*, this high affinity between metals and  $\text{Ca}^{2+}$  channels can also impair  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Viarengo et al., 1994), which could be responsible for the decrease of phagocytic activity.

Measurement of ROS production using flow cytometry frequently employs 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Hégaret et al., 2003; Lambert et al., 2003; Delaporte et al., 2007). After diffusion into cells, DCFH-DA is hydrolysed to

2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), which is then oxidised to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) by ROS, such as  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and released within phagocytic blood cells (Hégaret et al., 2003). Therefore, it has been suggested that ROS production is positively correlated with phagocytosis capacity. Our results confirmed this hypothesis, as both phagocytosis capacity and ROS production increased during chronic exposure but decreased during acute exposure. In addition, a hormesis-like effect on ROS production by haemocytes has also been observed by Auffret et al. (2002) in the oyster *O. edulis* under exposure to cadmium.

Flow cytometry analysis allows the examination of non-specific esterase activity, but few authors have used this biomarker (Gagnaire et al., 2007; Bado-Nilles et al., 2008), and Morga et al. (2011) have reported that this non-specific esterase activity can be recognised as reflecting the global activity of haemocytes. In this study, the activity of this enzyme was also stimulated by a moderate zinc level but inhibited by a high zinc level. Similar to zinc, cadmium is able to modulate non-specific esterase activity in haemocytes of *C. gigas* (Bouilly et al., 2006). Esterases are involved in the degradation of internalised particles after phagocytosis. Consequently, it was not surprising to find in the present study that non-specific esterase activity evolved concomitantly with phagocytic activity.

Zinc is an essential metal necessary for the functioning of numerous enzymes. In various invertebrates, phenoloxidase (PO) represents an important humoral defence system, which is also

found in *C. gigas* (Hellio et al., 2007). PO is a copper-containing enzyme and is present in haemocytes as an inactive form of prophe-noloxidase (ProPO). In the present work, PO activity varied with exposure time and zinc concentration employed. During chronic exposure, PO activity increased globally compared to the control group. Some authors have described an increase in PO activity after cadmium exposure in Pacific oysters (Bouilly et al., 2006), copper exposure in *M. edulis* (Pipe et al., 1999) and nickel exposure in the mud crab *S. serrata* (Vijayavel et al., 2009). Thiagarajan et al. (2006) suggested that increased levels of PO activity due to metal exposure could indirectly result in elevated ROS levels because PO intermediates generate superoxide anions during redox cycling of these intermediates. In contrast, in the present study, PO activity was found to increase at 96 h and decrease at 168 h during acute exposure. Some other authors have also shown that PO activity varies according to exposure time. PO activity in the plasma of *Perna viridis* was observed to decrease after 5 days of copper exposure but increase after 15 and 25 days (Thiagarajan et al., 2006). Thus, our results appeared to be in agreement with those obtained by these authors.

Metallothioneins (MTs) are low-molecular-mass cysteine-rich metal-binding proteins with a high affinity for heavy metal ions that are found in a wide variety of organisms. MTs display antioxidant functions and are involved in zinc homeostasis (Amiard et al., 2006). Our results showed that zinc treatment significantly increased MT mRNA expression in both the gills and the digestive glands under acute exposure and in the digestive gland during chronic exposure. These increases were time and dose dependent. In addition, MT mRNA expression levels were higher during acute exposure than chronic exposure in both gills and digestive glands. These observations are in accordance with the findings of Choi et al. (2008), who showed that cadmium treatment increases MT mRNA expression in a dose- and time-dependent manner in both the gills and the digestive gland of *C. gigas*. Marie et al. (2006a) have also shown that zinc exposure leads to a significant increase in MT concentrations in *Corbicula fluminea*. In contrast, these authors did not observe MT gene induction in *Dreissena polymorpha*. In the present study, it appeared that MT mRNA expression was correlated with zinc bioaccumulation in tissues, which also appears to be time and dose dependent (Caplat et al., 2012). Correlations between zinc concentrations and MT levels in tissues of some species of bivalves have been reported (Irato et al., 2003; Marie et al., 2006b). However, during chronic exposure, expression of MT mRNA was increased in gills, but not in the digestive gland, whereas the zinc concentration was higher in the digestive gland than in gills (Caplat et al., 2012). It therefore appeared that zinc accumulation in the digestive gland did not lead to MT induction. There are species-specific differences between the two tissues. For example, Irato et al. (2003) measured higher MT concentrations in the digestive gland of *Tapes philippinarum*, whereas they recorded higher MT concentrations in gills in *Mytilus galloprovincialis* and *Scapharca inaequivalvis*. Moreover, in these last two bivalve species, a good correlation between zinc and MT concentrations in gills has been reported (Irato et al., 2003). In addition, some authors have suggested that gills constitute an appropriate tissue in which to analyse the expression of the MT gene to evaluate metal pollution (Geret and Cosson, 1999; Irato et al., 2003; Marie et al., 2006a). The results of our study were in accordance with these results, demonstrating that MT is an appropriate biomarker for monitoring zinc pollution caused by a sacrificial anode. Unlike MT, the expression of MDR1 and SOD mRNA were not altered by zinc exposure. Some authors have reported MXR induction in the presence of zinc. Three days of exposure to 500  $\mu\text{g Zn L}^{-1}$  (the concentration that we used for chronic exposure) were found to induce MXR protein in the gills of *C. fluminea* (Achard et al., 2004). In *Perna perna*, zinc also provokes activation

of MXR activity (Franco et al., 2006). These results differ from those found in this study, in which we analysed mRNA levels, not protein levels. In future investigations, it could therefore be of interest to monitor the evolution of MDR1 protein quantities or activity in the gills or the digestive glands of oysters exposed to chronic and acute treatment of zinc in our experimental system to evaluate whether differences can be detected between mRNA levels and protein levels.

SOD is involved in an antioxidant defence system, as this enzyme catalysis  $\text{O}_2$  into  $\text{H}_2\text{O}_2$  (which is ultimately transformed by catalase to reduce toxicity) (Marklund and Marklund, 1974). We demonstrated that zinc modulates the production of ROS. Nevertheless, the expression of SOD mRNA did not vary in the presence of zinc. In the literature, it is generally reported that metal exposure results in upregulation of SOD mRNA expression or enzyme activity, although the effect of each metal is quite variable among tissues, times of exposure, organisms and pollutants (Regoli and Principato, 1995; Doyotte et al., 1997; Regoli et al., 1998; Company et al., 2004; Jing et al., 2006; Kim et al., 2007). For example, Cho et al. (2006) and Kim et al. (2007) have shown that zinc induces an increase of SOD mRNA expression in the fish *Oplegnathus fasciatus* and in the disk abalone *Haliotis discus discus*, respectively. SOD mRNA expression was found to increase in the gills and digestive gland of *H. discus discus* after 24 h and 72 h exposure to copper, cadmium and zinc (Kim et al., 2007). In contrast to the results of our study, this work has recorded an approximately 2-fold induction of SOD mRNA expression after 72 h of exposure to the same concentration used in our chronic exposure ( $10 \mu\text{M} \approx 0.65 \text{ mg L}^{-1}$ ). In our experiments, the first endpoint analysed correspond to 1 week, which is much longer than the 3 days of analysis used in the work by Kim et al. (2007). The difference observed in these two studies could be explained by this difference in timing. Therefore, it would be of interest to monitor the SOD mRNA level in our experimental device for shorter time lapses during the first week of exposure to more precisely analyse the evolution of mRNA expression.

We hypothesise that during exposure to a moderate zinc concentration, oysters present an adaptative metabolism leading to induction of MT, which protects organisms from mortality to some degree because no mortality and the highest zinc concentrations in the organs were recorded under these conditions (Caplat et al., 2012). Inversely, when zinc was present in excess, zinc accumulation was too rapid to allow MT to sequester this metal. As a consequence, zinc exposure resulted in a lower zinc concentration in the organs (Caplat et al., 2012), decreases in immune system parameters and high rates of oyster mortality under these conditions.

## 5. Conclusions

In summary, the present work demonstrated that zinc released from sacrificial anodes had an impact on *C. gigas*. This pollution source was able to modulate immune system activities. Exposure to a concentration of  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  stimulated all of the immune system biomarkers studied (phagocytosis, ROS production, non-specific esterase activity and phenoloxidase activity). In addition, no mortality was observed in this chronic exposure experiment. However, the number of circulating haemocytes decreased. Even so no drastic effect of zinc has been demonstrated in this study, we keep in mind that chronic exposure does stress the oyster possibly making them more vulnerable to disease. In contrast, exposure to a zinc concentration of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  resulted in a high level of mortality, a decrease in the number of circulating haemocytes and an inhibition of immune parameters. Zinc is therefore an essential metal that can become toxic for oysters if present in high levels. Our exposure conditions did not induce SOD or MXR mRNA expression. However, a dose- and time-dependent increase of MT mRNA

expression was observed in the gills and the digestive gland of exposed oysters, which is probably correlated with zinc accumulation in these tissues. Metallothioneins are able to sequester metals and regulate zinc homeostasis.

## Acknowledgements

E. Mottin's work was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors thank Corrodys for the Hall des Flamands, L. Poulain and M. Duval (Plateau Technique de Cytométrie en Flux, IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie) for their helpful technical assistance in flow cytometry studies and, finally, Elsevier Language Editing Services for English revision.

## References

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357.
- Amado Filho, G.M., Karez, C.S., Andrade, L.R., Yoneshigue-Valentin, Y., Pfeiffer, W.C., 1997. Effects on growth and accumulation of zinc in six seaweed species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 223–228.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the european flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar. Environ. Res.* 54, 585–589.
- Auffret, M., 2005. Bivalves as models for marine immunotoxicology. In: Tryphonas, H., Fournier, M., Blakley, B.R., Smits, J.E.G., Brousseau, P. (Eds.), *Investigative Immunotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 29–48.
- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 549–559.
- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Toxicol. In Vitro* 22, 1610–1617.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910–1917.
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Boudou, A., Blanc, G., 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Total Environ.* 337, 265–280.
- Bebiano, M.J., Gêret, F., Hoarau, P., Serafim, M.A., Coelho, M.R., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussates*: a potential bioindicator species. *Biomarkers* 9, 305–330.
- Bellas, J., Granmo, A., Beiras, R., 2005. Embryotoxicity of the antifouling biocide zinc pyrrhione to sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1382–1385.
- Bird, P., Comber, S.D.W., Gardner, M.J., Ravenscroft, J.E., 1996. Zinc inputs to coastal waters from sacrificial anodes. *Sci. Total Environ.* 181, 257–264.
- Bordin, G., McCourt, J., Cordeiro Raposo, F., Rodriguez, A.R., 1997. Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma baltica*: seasonal variation and induction upon metal exposure. *Mar. Biol.* 129, 453–463.
- Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomas-Guyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapègue, S., 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 78, 149–156.
- Brereton, A., Lord, H., Thornton, I., Webb, J.S., 1973. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 19, 96–101.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology* 142, 145–156.
- Cai, L., Satoh, M., Tohyama, C., Cherian, M.G., 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132, 85–98.
- Calabrese, E.J., Blain, R.B., 2011. The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 61, 73–81.
- Caplat, C., Oral, R., Mahaut, M.L., Mao, A., Barillier, D., Guida, M., Della Rocca, C., Pagano, G., 2010. Comparative toxicities of aluminum and zinc from sacrificial anodes or from sulfate salt in sea urchin embryos and sperm. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1138–1143.
- Caplat, C., Mottin, E., Lebel, J.M., Serpentine, A., Barillier, D., Mahaut, M.L., 2012. Impact of a sacrificial anode as assessed by zinc accumulation in different organs of the oyster *Crassostrea gigas*: results from long- and short-term laboratory tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 638–649.
- Cheng, T.C., 1988. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytic indices. *J. Invert. Pathol.* 51, 215–220.
- Cheng, T.C., Sullivan, J.T., 1984. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Mar. Environ. Res.* 14, 305–315.
- Cho, Y.S., Choi, B.N., Kim, K.H., Kim, S.K., Kim, D.S., Bang, I.C., Nam, Y.K., 2006. Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA during exposures to heavy metals in rockbream (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture* 253, 667–679.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 286–292.
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Burighel, P., 1998. Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 160–165.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Organ.* 22, 59–65.
- Company, R., Serafim, A., Bebianno, M.J., Cosson, R., Shillito, B., Fiala-Medioni, A., 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377–381.
- Daby, D., 2006. Coastal pollution and potential biomarkers of metals in Mauritius. *Water Air Soil Pollut.* 174, 63–91.
- Dardenne, M., 2002. Zinc and immune function. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, S20–S23.
- Delaport, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353, 45–57.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93–110.
- Duchemin, M.B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., Fournier, M., 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, *in tubo* and *in vitro* exposures. *Environ. Pollut.* 153, 416–423.
- El Atti-Hellal, M., Hedhili, A., Dachraoui, M., 2007. Contents of trace metals in water and macroalgae along the mediterranean coast of Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78, 33–37.
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fievet, B., 2007. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci. Total Environ.* 374, 328–341.
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress maker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chap.* 14, 371–380.
- Filipiak, M., Bilska, E., Tylko, G., Pyza, E., 2010. Effects of zinc on programmed cell death of *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* blood cells. *J. Insect Physiol.* 56, 383–390.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201–211.
- Franco, J.L., Trivella, D.B.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R.F., Baily, A.C.D., Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chem. Biol. Interact.* 160, 232–240.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol. Toxicol.* 22, 1–14.
- Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J.Y., Saulnier, D., Renault, T., 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat. Toxicol.* 84, 92–102.
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10, 5–23.
- Geret, F., Cosson, R.P., 1999. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique: variabilité entre sites et organes chez l'huître *Crassostrea gigas*. *Oceanol. Acta* 23, 261–271.
- Girón-Perez, M.I., 2010. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *ISJ* 7, 149–156.
- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M., Ratcliffe, N.A., 1996. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 34, 273–290.
- Guo, G., Yan-Sanders, Y., Lyn-Cook, B.D., Wang, T., Tamae, D., Ogi, J., Khaletskiy, A., Li, Z., Weydert, C., Longmate, J.A., Huang, T.-T., Spitz, D.R., Oberley, L.W., Li, J.J., 2003. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2362–2378.
- Hamed, M.A., Emara, A.M., 2006. Marine molluscs as biomarkers for heavy metal levels in the Gulf of Suez, Red Sea. *J. Mar. Syst.* 60, 220–234.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Sundt, R.C., Galloway, T.S., 2009. Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. *Environ. Pollut.* 157, 1939–1944.
- Hansen, B.H., Rømma, S., Garmo, Ø.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo*

- trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 263–274.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249–265.
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 433–440.
- Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T., Gomez-Jimenez, S., Portillo-Clark, G., Vargas-Albores, F., 2003. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 14, 105–114.
- Irato, P., Santovito, G., Cassini, A., Piccinni, E., Albergoni, V., 2003. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 476–484.
- Jing, G., Li, Y., Xie, L., Zhang, R., 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comp. Biochem. Physiol. C* 144, 184–190.
- Jo, P.G., Choi, Y.K., Choi, C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 460–469.
- Jorge, R.A.D.L.V.C., Moreira, G.S., 2005. Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 280–285.
- Kim, K.Y., Lee, S.Y., Cho, Y.S., Bang, I.C., Kim, K.H., Kim, D.S., Nam, Y.K., 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1043–1059.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225–240.
- Lorenzon, S., Francesc, M., Smith, V.J., Ferrero, E.A., 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 459–472.
- Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.P., Boudou, A., 2006a. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals* 19, 399–407.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006b. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617.
- Marklund, S., Marklund, C.T., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474.
- Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M., Leboulenger, F., 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 54, 455–459.
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Chollet, B., Arzul, I., 2011. Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during *in vitro* infection by the parasite *Bonamia ostreae*. *Int. J. Parasitol.* 41, 755–764.
- Mottin, E., Caplat, C., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.M., Serpentin, A., 2010. Effect of *in vitro* exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 846–853.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 162, 125–135.
- Otero, G., Avila, M.A., Emfietzoglou, D., Clerch, L.B., Massaro, D., Notario, V., 1996. Increased manganese superoxide dismutase activity, protein, and mRNA levels and concurrent induction of tumor necrosis factor alpha in radiation-initiated Syrian hamster cells. *Mol. Carcinog.* 17, 175–180.
- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Giordano, G.G., Trieff, N.M., 1986. The sea urchin: bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In: Cairns, J., Jr. (Ed.), *Community Toxicity Testing*. Association for Standard Testing and Materials. ASTM, Philadelphia, pp. 67–92.
- Parry, H.E., Pipe, R.K., 2004. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 69, 311–325.
- Perez, D.G., Fontanetti, C.S., 2010. Hemocytical responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environ. Monit. Assess.* 177, 437–447.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 581–595.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M., Ramanathan, K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46, 43–54.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.* 40, 375–392.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81–114.
- Saez, G., De Jong, L., Moreau, X., Sarrazin, L., Wafo, E., Schembri, T., Lagadec, V., Diana, C., Monod, J.L., Thiéry, A., 2008. Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: a step for *in situ* calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. *Environ. Res.* 107, 351–361.
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J., 2000. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr. Res.* 20, 737–755.
- Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 21–29.
- Sorvari, J., Rantala, L.M., Rantala, M.J., Hakkarainen, H., Eeva, T., 2007. Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. *Environ. Pollut.* 145, 324–328.
- Srinivasa Reddy, M., Basha, S., Joshi, H.V., Ramachandiraiah, G., 2005. Seasonal distribution and contamination levels of total PHCs, PAHs and heavy metals in coastal waters of the Alang-Sosiya ship scrapping yard, Gulf of Cambay, India. *Chemosphere* 61, 1587–1593.
- Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis: the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total Environ.* 22, 213–234.
- Terrés-Martos, C., Navarro-Alarcón, M., Martín-Lagos, F., Giménez-Martínez, R., López-García De La Serrana, H., López-Martínez, M.C., 2002. Determination of zinc levels in waters from southeastern Spain by electrothermal atomic absorption spectrometry: relationship with industrial activity. *Water Res.* 36, 1912–1916.
- Thiagarajan, R., Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., 2006. Immunomodulation in the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 393–399.
- Vallee, B.L., Falchuk, K.H., 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73, 79–118.
- Viarengo, A., Nicotera, P., 1991. Possible role of  $Ca^{2+}$  in heavy metal cytotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 81–84.
- Viarengo, A., Canesi, L., Moore, M.N., Orunesu, M., 1994. Effects of  $Hg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on the cytosolic  $Ca^{2+}$  level in molluscan blood cells evaluated by confocal microscopy and spectrofluorimetry. *Mar. Biol.* 119, 557–564.
- Victor, B., 1993. Responses of haemocytes and gill tissue to sublethal cadmium chloride poisoning in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 432–439.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Thiagarajan, R., Thilagam, H., 2009. Immunotoxic effects of nickel in the mud crab *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 133–139.
- Wagner, P., Little, B., Hart, K., Ray, R., Thomas, D., Trzaskoma-Paulette, P., Lucas, K., 1996. Environmental fate of sacrificial zinc anodes and influence of a biofilm. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 37, 151–157.
- Wiklund, A.K.E., Börjesson, T., Wiklund, S.J., 2006. Avoidance response of sediment living amphipods to zinc pyrithione as a measure of sediment toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 96–99.



## **C.2 Communications affichées**

# Effect of herbicides on the lysosomal system of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Antoine MOTTIER, Alexandre DEVOS, Edwige GUERLET, Antoine SERPENTINI, Jean Marc LEBEL & Katherine COSTIL

UMR 100 IFREMER «Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins», IFR 146 ICORE, IBFA, University of Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen cedex. France.

In the past decade, Pacific oysters reared in various French oyster production areas sporadically experienced significant summer mortality events which appeared to be due to a combination of extrinsic and intrinsic factors (Samain & Mc Combie, 2008). In this context, pesticides have been suspected to be involved as potential additional stressors (Gagnaire, 2005; Buisson *et al.*, 2008). Experimental exposures were thus conducted to assess the effect of glyphosate, one of the most used herbicide, on the lysosomal system of both hemocytes and digestive gland cells of *Crassostrea gigas*. This system plays an essential role in cellular turnover and detoxication, including the sequestration of a wide range of contaminants. Various stressors can induce a destabilization of the lysosomal membranes which can finally lead to cell lysis.



## Materials and Methods

31/33-month-old oysters were exposed to glyphosate concentrations for 14 days (« chronic exposure ») or 48h (« acute exposure »):

« Chronic exposure »: 0 µg/L (control), 0.1 µg/L, 1 µg/L and 10 µg/L

« Acute exposure »: 0 µg/L (control), 10 µg/L, 100 µg/L and 500 µg/L

Exposure conditions: 16°C, 12-h photoperiod, daily microalgae supply (*Chaetoceros calcitrans* + *Isochrysis galbana*) during the chronic exposure. Water and pesticides were renewed daily.

The lysosome system was studied using 3 methods: the Neutral Red Retention Assay (NRRA) and flow cytometry (with an acidotropic probe: LysoTracker®) both applied to oyster hemocytes and, histochemistry (revelation of β-glucuronidase) applied to the digestive cells.

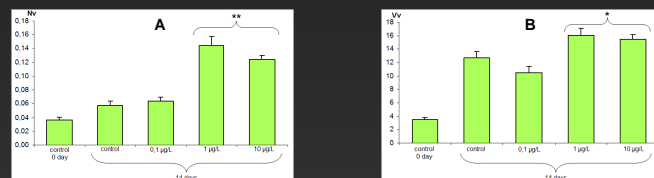
In addition, histology was performed to evaluate the physiological state of the studied oysters and, the biomarker results were validated only if the oysters were in a good general state of health.

## Results about the digestive gland cells

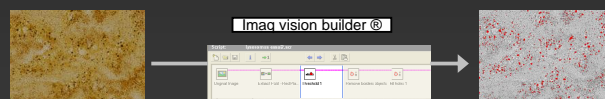
### « Chronic exposure »

### Histochemistry

β-glucuronidase is one of the main lysosomal enzymes and, its revelation by histochemistry coupled with image analysis gives information about the lysosomal particles, e.g. number (Nv) and volume (Vv) relative to the digestive gland tissue (Carajaville *et al.*, 1991)



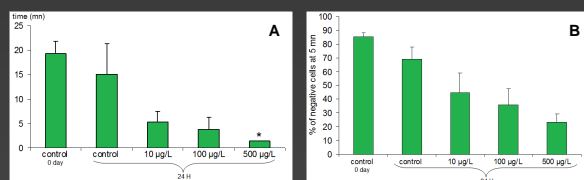
Number (A) and volume (B) of lysosomes in the digestive gland cells from oysters exposed to various concentrations of glyphosate at 0 and 14 days



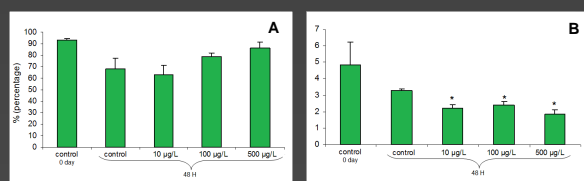
### « Acute exposure »

## Results about the hemocytes

### « Chronic exposure »



Neutral Red Retention Time (min) (A) and percentage of non-destabilized granulocytes (B) of oysters exposed to various concentrations of glyphosate at 0 and 24h



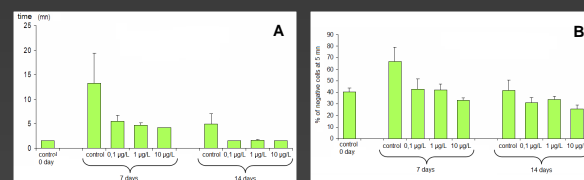
Percentage of cells labeled by LysoTracker® (A) and mean of fluorescence intensity (B) in haemolymph withdrawn from oysters exposed to various concentrations of glyphosate at 0 and 48h

### NRRA

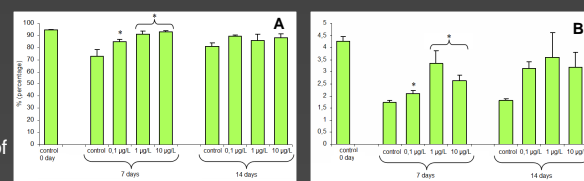
Neutral Red Retention Assay (NRRA) was applied to granulocytes. Neutral Red Retention times were short in comparison with literature data. The % of non-destabilized cells at 5 min were thus also considered.

### Flow cytometry

The % of labeled cells corresponds to the % of cells which have lysosomes with a stable membrane (e.g. granulocytes in this study). The mean of fluorescence indicates the number of labeled particles (lysosomes) per cell.



Neutral Red Retention Time (min) (A) and percentage of non-destabilized granulocytes (B) of oysters exposed to various concentrations of glyphosate at 0, 7 and 14 days



Percentage of cells labeled by LysoTracker® (A) and mean of fluorescence intensity (B) in haemolymph withdrawn from oysters exposed to various concentrations of glyphosate at 0, 7 and 14 days

### « Acute exposure »

## Conclusion

### « Chronic exposure »

Decrease of the mean of fluorescence

Decrease of the neutral red retention time

The number of non-destabilized granulocytes tended to decrease

Damage to the lysosomal system ?

Increase of the fluorescent cells

More granulocytes than hyalinocytes ?

Rise of the mean of fluorescence

More lysosomes by cell ?

Increase of the number and the volume of lysosomes

More lysosomes by cell ?

The neutral red retention time tended to decrease

Decrease of lysosomal membrane stability ?

Stimulation of the lysosomal System ?

Antoine MOTTIER<sup>1</sup>, Valérie KIENTZ-BOUCHARD<sup>2</sup>, Antoine SERPENTINI<sup>1</sup>, Jean Marc LEBEL<sup>1</sup> and Katherine COSTIL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: CNRS-INEE FRE 3484 BioMEA (Biologie de Mollusques Marins et des Écosystèmes Associés), Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France.

<sup>2</sup>: Laboratoire Départemental Franck Duncombe, Saint-Contest, 14053 Caen Cedex, France.

## INTRODUCTION

### Context:

• **Littoral environments** → submitted to various pollutants originating from domestic, industrial and agricultural activities

↳ INTERREG IVA CHRONEXPO:  
Effect of chronic exposures to various pollutants on the Channel organisms

• ***Crassostrea gigas*** → economically important species affected by summer mortalities.

• **Pesticides (including herbicides)** → could be involved in summer mortalities as **additional stressors**

### Objectives:

• Assess the effect of large ranges of herbicides on **embryo-larval development** and **metamorphosis** of *Crassostrea gigas*

• To choose interesting molecules for **long time exposures**

## MATERIEL AND METHODS

### Tested chemicals

• **Glyphosate** → OC(=O)COP(=O)(O)O Analogue of glycine

• **AminoMethyl Phosphonique Acide (AMPA)** → OC(=O)COP(=O)(O)O Glyphosate metabolite

• **Roundup Express®** } Glyphosate + adjuvants  
• **Roundup Allées et Terrasses®** } Commercial formulations

Concentrations of Glyphosate and AMPA were analysed using UPLC and Fluorometric detection (in according with NF ISO 21458) at the beginning and after 48 hours in order to verify the variation of the tested concentrations.

• **Mecoprop** → CC(C)C(=O)OC1=CC=C(C=C1)C2=CC=CC=C2 Mixture of two stereoisomers

• **Mecoprop-P** → CC(C)C(=O)OC1=CC=C(C=C1)C2=CC=CC=C2 (R)-(-)-enantiomer alone

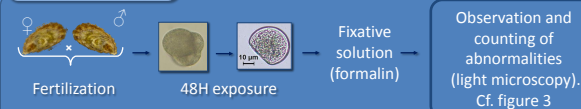
• **4-Chloro-2-methylphenol (4C2M)** → CC1=CC=C(C=C1)C(=O)O Mecoprops metabolite

### Metamorphosis assay



- Pediveliger spot-eyed larvae → between 50 and 80 larvae/well.
- Multiwell plate : larvae + 1,5 mL of contaminant + 10<sup>-4</sup> M of epinephrine/well
- Incubation: 48h /25°C.
- Endpoints: % of mortality and metamorphosis, EC50

### Embryotoxicity



- Exposure in pillbox (25 ml) → 1,500 embryos/pillbox
- Incubation 48h /22°C.
- CuSO<sub>4</sub> use as positive control: toxicity of
- Endpoints: % of normal larvae, kinds of abnormalities, EC50

## RESULTS Embryotoxicity

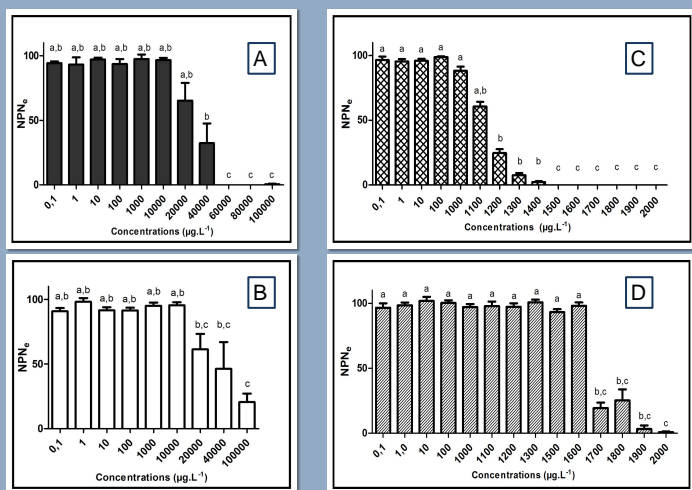


Fig. 1 : Net percentages of normal development (NPN) (± SEM) in *C. gigas* observed after 48h of exposure to glyphosate (A), AMPA (B), Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) (C) and Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>) (D). The concentrations that do not share a letter are significantly different; by convention controls belong to group a.

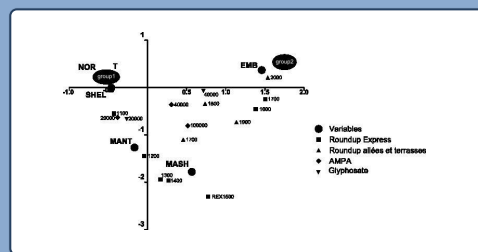


Fig.2 : Simultaneous representation of the barycentres of the various modalities of embryo-larval development and the different herbicide concentrations on axes 1 and 2 of the factorial correspondence analysis performed on the all data set. NOR: normal D-larvae; SHEL: D-larvae exhibiting shell and/or hinge abnormalities; MANT: D-larva showing a hypertrophied mantle; MASH: D-larvae presenting abnormality affecting both shell/hinge and mantle; EMB: "old embryo"; GLY: glyphosate; REX: Roundup Express®; RAT: Roundup Allées et Terrasses®. Group 1 corresponds to the concentrations ranging from 0.1 to 10,000 µg.L<sup>-1</sup> for glyphosate and AMPA, from 0.1 to 1,600 µg.L<sup>-1</sup> for R<sub>EX</sub> and from 0.1 to 100 µg.L<sup>-1</sup> for R<sub>AT</sub>. Group 2 corresponds to the concentrations of 60,000; 80,000 and 100,000 µg.L<sup>-1</sup> for glyphosate and 1,800; 1,900 and 2,000 µg.L<sup>-1</sup> for R<sub>EX</sub>.

Meco-p	Mecoprop	Glyphosate	AMPA	4C2M	R.A.T	R.Ex
60.41 mg.L <sup>-1</sup>	42.74 mg.L <sup>-1</sup>	38.33 mg.L <sup>-1</sup>	34.34 mg.L <sup>-1</sup>	13.05 mg.L <sup>-1</sup>	1.67 mg.L <sup>-1</sup>	1.13 mg.L <sup>-1</sup>

Table 1. Effective concentrations inducing 50 % of abnormalities (EC50) calculated for the embryotoxicity assay after 48 h exposures

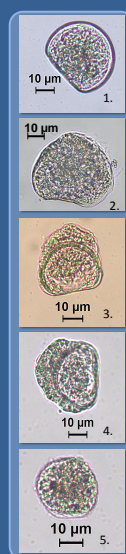


Fig.3 : Light microscopy images (x400) of *Crassostrea gigas* larvae at 48h: normal D-shaped veliger (1.); D-shaped veliger showing abnormal shell and/or hinge (2.); D-shaped veliger presenting hypertrophied mantle (3.); D-shaped veliger exhibiting both shell/hinge and mantle abnormality (4.); embryo showing an arrested development at stage "old embryo" (5.).

## RESULTS Metamorphosis

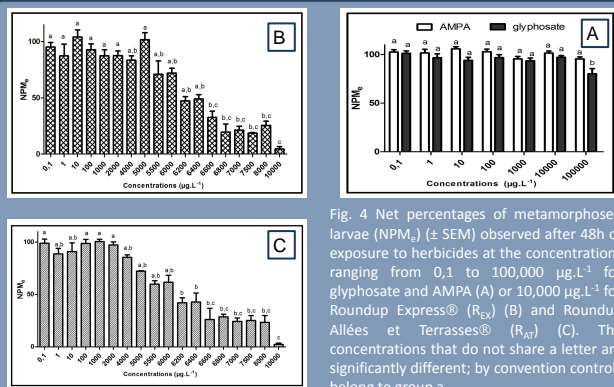


Fig. 4 Net percentages of metamorphosed larvae (NPM) (± SEM) observed after 48h of exposure to herbicides at the concentrations ranging from 0.1 to 100,000 µg.L<sup>-1</sup> for glyphosate and AMPA (A) or 10,000 µg.L<sup>-1</sup> for Roundup Express® (R<sub>EX</sub>) (B) and Roundup Allées et Terrasses® (R<sub>AT</sub>) (C). The concentrations that do not share a letter are significantly different; by convention controls belong to group a.

## CONCLUSION

### Glyphosate family

#### Metamorphosis assay

- Active matter and metabolite: very limited toxicity
- Commercial formulations: more toxic than active matter alone

↳ **Adjuvant toxicity?**

#### Embryotoxicity assay

- Active matter and metabolite~ same toxicity
- Commercial formulations: more toxic than active matter alone
- ↳ **Adjuvant toxicity?**
- FCA → gradient in abnormality severity  
shell<mantle< shell+mantle<arrested development

### Mecoprop family

#### Metamorphosis assay

- Mecoprop and Mecoprop-P: very limited toxicity
- Metabolite (4C2M) more toxic than parent compound

#### Embryotoxicity assay

- Mecoprop-P more toxic than Mecoprop
- Metabolite (4C2M) more toxic than parent compound

Mecoprop	AMPA	Glyphosate	Meco-p	4C2M	R.Ex	R.A.T
>100 mg.L <sup>-1</sup>	>100 mg.L <sup>-1</sup>	>100 mg.L <sup>-1</sup>	>100 mg.L <sup>-1</sup>	7.10 mg.L <sup>-1</sup>	6.37 mg.L <sup>-1</sup>	6.06 mg.L <sup>-1</sup>

Table 2. Effective concentrations inducing 50 % of lack of metamorphosis (EC50) calculated after 48 h exposures

- D-larvae more sensitive than pediveliger larvae
- Commercial formulations more toxic than active matter alone
- It is important to study the effects of degradation compounds
- No effect of environmental doses with short exposure → chronic exposures are needed

Antoine MOTTIER, Charles LE PABIC, Katherine COSTIL, Noussithé KOUETA, Jean Marc LEBEL and Antoine SERPENTINI

CNRS-INEE FRE 3484 BioMEA (Biologie de Mollusques Marins et des Ecosystèmes Associés), Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France.

## INTRODUCTION

### Context:

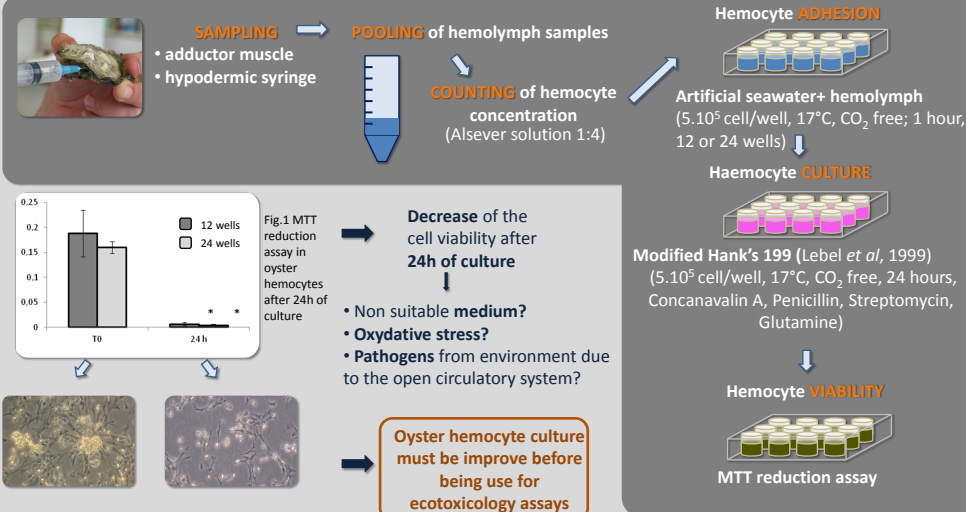
• Littoral environments → submitted to various pollutants originating from domestic, industrial and agricultural activities

INTERREG IVA CHRONEXPO:  
Effect of chronic exposures to various pollutants on the Channel organisms

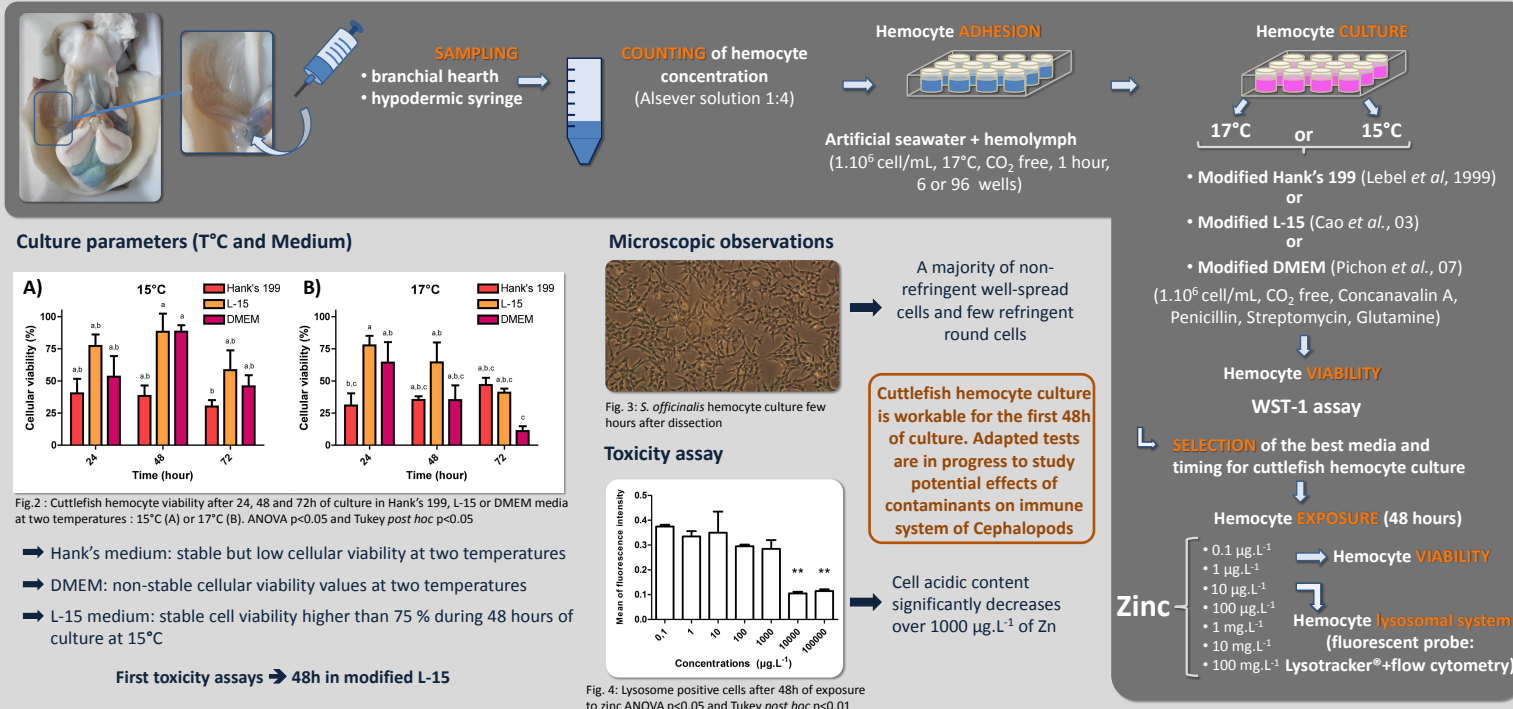
### Objectives:

- Improve culture parameters of hemocytes from three economically important mollusc groups : Bivalves, Gastropods and Cephalopods
- Study the effect of exposure to different families of pollutants (pesticides, metals...) on hemocytes
- Compare results from three different taxonomic group of molluscs

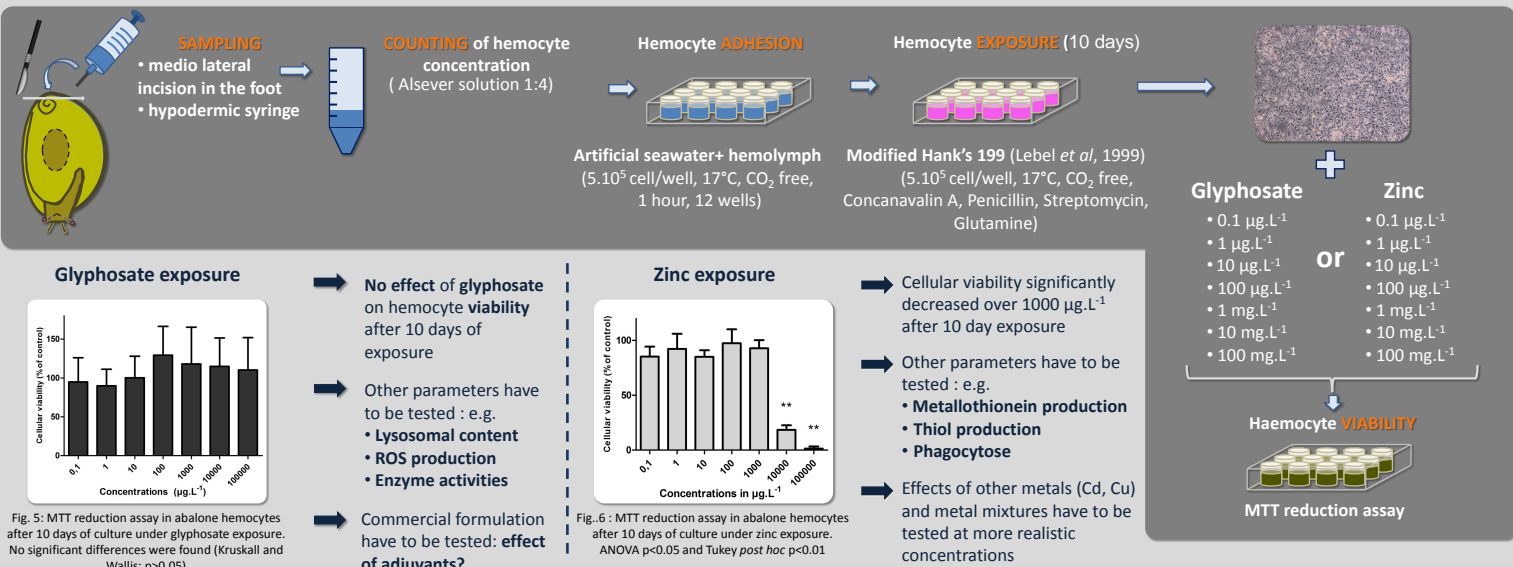
## Crassostrea gigas hemocytes



## Sepia officinalis hemocytes



## Haliotis tuberculata hemocytes





Antoine MOTTIER, Jean Marc LEBEL, Antoine SERPENTINI et Katherine COSTIL

CNRS-INEE FRE 3484 BioMEA (Biologie de Mollusques Marins et des Ecosystèmes Associés), Normandie université, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France.

Les écosystèmes littoraux sont soumis à de fortes pressions anthropiques; dans le cadre de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin, il convient d'en évaluer la contamination mais aussi l'effet des contaminants sur les organismes de la frange côtière. Bien que les concentrations environnementales en produits phytosanitaires soient souvent faibles en milieu littoral, les pesticides sont suspectés d'être des facteurs de stress supplémentaires pouvant potentiellement aggraver le mauvais état physiologique dans lequel se trouvent les huîtres lors d'épisodes de mortalités estivales. Le but final de ce travail est donc d'étudier l'effet de contaminations chroniques sur les huîtres à des doses environnementales de pesticides. Cependant, afin de sélectionner des molécules pertinentes et de pouvoir comparer leur toxicité, l'utilisation d'outils donnant des réponses rapides sur la sensibilité des espèces et des différents stades a d'abord été mise en place. Deux modèles différents ont alors été utilisés : l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) et l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Trois contaminants ont été testés: un herbicide total (glyphosate), une formulation commerciale à base de glyphosate (Roundup® express) et un adjuvant seul (Amines Poly Ethoxylées: POEA).

## *Haliotis tuberculata*: hémocytes

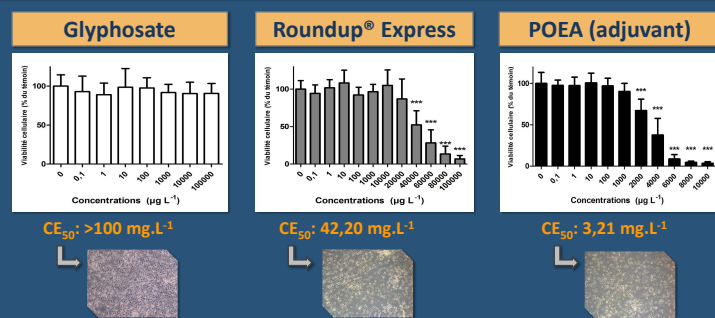
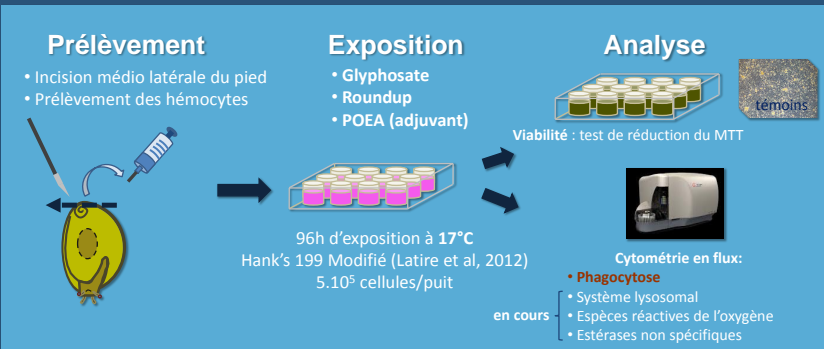


Figure 1: Pourcentages de viabilité d'hémocytes d'*Haliotis tuberculata* exposés à une gamme de concentrations en contaminants (test de réduction du MTT)

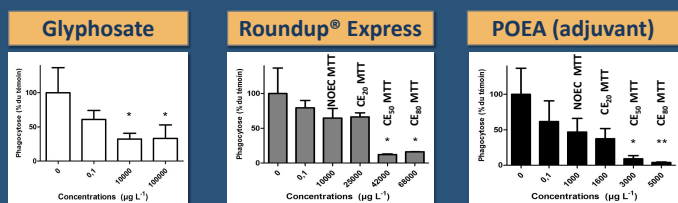


Figure 2: pourcentage de phagocytose des hémocytes d'*Haliotis tuberculata* exposés à une gamme de concentrations en contaminants (analyse en cytométrie en flux)

- **Glyphosate**: pas d'effets sur la viabilité des hémocytes jusqu'à 100 mg L<sup>-1</sup>
- **Roundup®**: cytotoxicité relativement limitée ; CE<sub>50</sub> de 42,2 mg L<sup>-1</sup> (en équivalent glyphosate)
- **Adjuvant**: cytotoxicité observée dès 2 mg L<sup>-1</sup>

**Adjuvant plus toxique que la matière active seule et responsable de la mort cellulaire**

- **Glyphosate**: baisse significative de la phagocytose aux concentrations testées tendance à la baisse dès 0.1 µg L<sup>-1</sup>
- **Roundup® et adjuvant**: baisse significative de la phagocytose dès la CE<sub>50</sub> MTT tendance à la baisse dès 0.1 µg L<sup>-1</sup>

**Effet du glyphosate et des adjuvants sur les hémocytes aux concentrations sublétales**

## *Crassostrea gigas*: stades larvaires

### Embryotoxicité

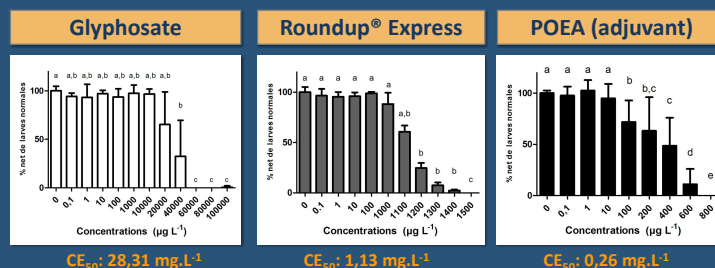
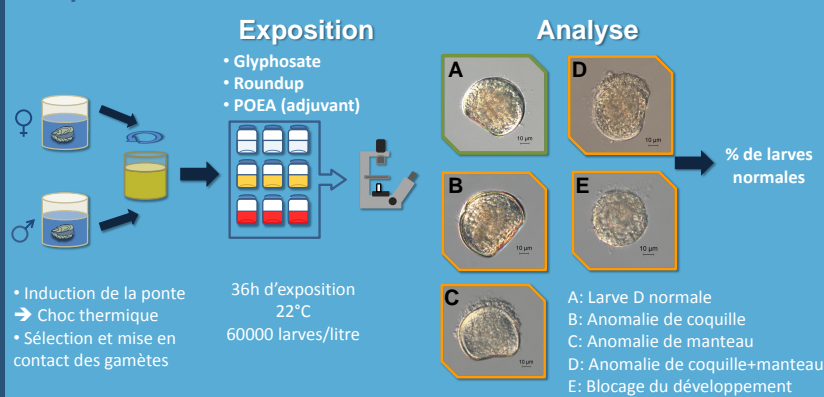


Figure 3: Pourcentages nets de larves normales chez *C. gigas* après 36h d'exposition à une gamme de concentrations en contaminants

- **Matière active seule**: toxicité limitée
- **Roundup® et adjuvant seul**: toxique et très toxique

Classification Européenne de la toxicité aquatique (2000)

**POEA (adjuvant) semble être le composé responsable de la toxicité des herbicides à base de glyphosate sur le développement embryonnaire-larvaire de *C. gigas*.**

### Métamorphose

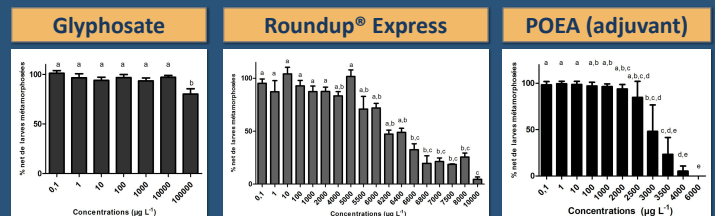
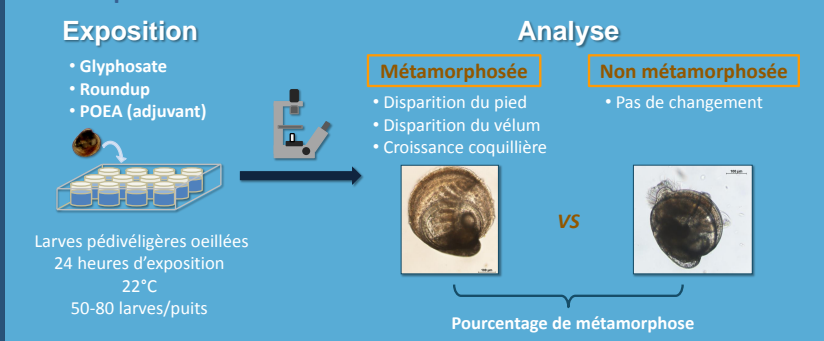


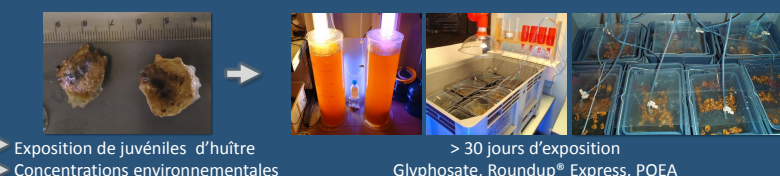
Figure 4: Pourcentages nets de larves métamorphosées chez *C. gigas* après 24h d'exposition à une gamme de concentrations en contaminants

- **Matière active seule**: non toxique
- **Roundup® et adjuvant seul**: toxique

Classification Européenne de la toxicité aquatique (2000)

**POEA (adjuvant) semble être le composé responsable de la toxicité des herbicides à base de glyphosate sur le processus de métamorphose de *C. gigas*.**

## *Crassostrea gigas*: juvéniles, expositions longues (travaux en cours)



➤ Exposition de juvéniles d'huître

➤ Concentrations environnementales

> 30 jours d'exposition  
Glyphosate, Roundup® Express, POEA

- Biométries: croissance, indices de condition
- Histologie: état des tissus, développement de la gonade...
- Histochimie: dynamique du système lysosomal.
- Mesures d'activités enzymatiques: catalase, GST, SOD...
- Biologie moléculaire: expression de gènes d'intérêts (GST, MT, MXR, Hsp90...)

antoine.mottier@hotmail.fr

### Bibliographie:

Latire, T., Le Pabic, C., Mottier, E., Mottier, A., Costil, K., Koueta, N., Lebel, J.-M., et al. (2012). Responses of primary cultured hemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology*, 109(0), 213-221.

Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentin, A., Lebel, J. M., Jha, A. N., & Costil, K. (2013). Effects of glyphosate-based herbicides on embryonic-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 128-129(0), 67-78.

**Résumé :** Ce travail de thèse vise à étudier l'impact de molécules herbicides parmi les plus utilisées en France et dans le monde, sur deux espèces de mollusques exploitées : l'ormeau, *Haliotis tuberculata* et l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Les travaux ont porté sur des expositions réalisées en laboratoire et deux approches différentes ont été mises en œuvre. Une première approche *in vitro* s'est intéressée chez *H. tuberculata* aux effets d'une matière active seule (glyphosate), d'une formulation commerciale (Roundup Express®) et d'un mélange d'adjuvants (POEAs) sur les hémocytes, cellules responsables de la fonction immunitaire chez les mollusques. Les résultats ont montré une toxicité accrue de la formulation commerciale et des adjuvants qui semblerait liée à des effets au niveau des membranes biologiques. La toxicité plus importante des formulations commerciales due aux adjuvants a également été démontrée lors de la seconde approche *in vivo* chez *C. gigas*. Des bioessais sur les larves véligères D et sur des larves pédivéligères ont permis de mettre en évidence la sensibilité des stades les plus jeunes et l'importance d'étudier non seulement les matières actives (glyphosate, mecoprop, mecoprop-p) mais aussi l'ensemble des composés apparentés : produits de dégradation (AMPA, 2-MCP), matière active formulée (Roundup®) et adjuvants (POEAs). Enfin, des expositions de juvéniles de *C. gigas* pendant un temps supérieur ou égal à un mois suggèrent des effets au niveau moléculaire avec l'activation de systèmes de détoxification mais aussi au niveau intégré avec des perturbations de la croissance et du déroulement de la gamétogenèse pour les individus exposés aux plus faibles doses de Roundup® et de POEAs (notamment 0,1 µg L<sup>-1</sup> qui peut correspondre à une concentration environnementale). Les herbicides aux doses environnementales ne peuvent pas engendrer de mortalités ostréicoles pour les stades de vie étudiés mais ils peuvent constituer des facteurs de stress dans les périodes précédant les mortalités estivales.

**Mots clés :** *Crassostrea gigas*, *Haliotis tuberculata*, écotoxicologie, herbicides, glyphosate, Roundup®, mecoprop, hémocytes, stades embryo-larvaires, juvéniles, expositions subchroniques.

**Abstract :** This work aimed to assess the effects of worldwide used herbicides on two economically important mollusc species : the abalone *Haliotis tuberculata* and the cupped oyster *Crassostrea gigas*. The researches dealt with *in vitro* and *in vivo* laboratory experiments. *In vitro* experiments on *H. tuberculata* haemocytes were performed in order to assess the effects of an active matter (glyphosate), a commercial formulation (Roundup express® : R<sub>EX</sub>) and a mixture of adjuvants (POEAs). Results showed a greater toxicity of exposures to R<sub>EX</sub> and POEAs which appeared to act on biological membranes. *In vivo* experiments on *C. gigas* also clearly demonstrated the toxicity of commercial formulations and adjuvants. Bioassays on early life stages (D veliger and pediveliger) allowed us to assess the toxicity of a relatively large number of active matters (glyphosate, mecoprop, mecoprop-p), degradation compounds (AMPA, 2-MCP), commercial formulations (Roundup®) and adjuvant mixture (POEAs). Results provided interesting information on the relative toxicity of the tested chemicals and showed the sensitivity of the earliest life stage (i.e. D veliger larvae). Long time exposures (up to 56 days) of *C. gigas* juveniles revealed an activation of the defense mechanisms at the molecular level but also physiological perturbations with a slowdown in growth and gametogenesis of oysters exposed to the lowest doses of Roundup and POEAs (i.e at the dose of 0.1 µg L<sup>-1</sup> which could be measured in the environment). Environmentally relevant doses of pesticides cannot lead to oyster mortality but could be considered as additional stressors during the periods prior to summer mortalities.

**Keywords :** *Crassostrea gigas*, *Haliotis tuberculata*, ecotoxicology, herbicides, glyphosate, Roundup®, mecoprop, haemocytes, embryo-larval stages, juveniles, subchronic exposures.

Discipline : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions.

CNRS INEE - FRE 3484 BioMEA "Biologie des Mollusques marins et des Écosystèmes Associés". Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex.